

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



**FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE
E NATURALI
DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA AVANZATA
XXII CICLO**

**SILENZIAMENTO DEI GENI MHCII:
UN POSSIBILE APPROCCIO TERAPEUTICO ALLA
PREVENZIONE DI MALATTIE AUTOIMMUNI**

Candidata
Laura Pisapia

Co-Tutor
Dott.ssa Giovanna De Pozzo

Cordinatore
Prof. Luciano Gaudio

Tutor
Prof.ssa Laura Fucci

Anno Accademico 2008/2009

Indice

1	INTRODUZIONE	3
1.1	Le molecole MHC di Classe II.....	4
1.1.1	Struttura delle molecole MHC II.....	4
1.1.2	Organizzazione dei Geni MHCII di Classe II	5
1.2	Regolazione delle molecole MHCII.....	7
1.2.1	Espressione costitutiva ed inducibile	7
1.2.2	APC Professionali e non Professionali.	8
1.2.3	Regolazione trascrizionale	9
1.2.3.1	CIITA.....	10
1.2.3.2	Isoforme del Transattivatore di classe II.....	11
1.2.3.3	Regolazione del'isoforma CIITA pIV	13
1.2.3.4	Interferone e attivazione dei geni ISGs.....	14
1.2.3.5	I geni ISGs e il pathway di trasduzione del segnale JAK/STAT	14
1.2.3.6	Fattori coinvolti nella regolazione dei geni ISG	17
1.3	Antigeni MHCII: riscontri in ambito patologico.....	19
1.3.1	Molecole MHC II e tumori	19
1.3.2	Molecole MHC II : autoimmunità e trapianti	21
1.4	Obiettivo della tesi.....	22

2	MATERIALI E METODI.....	24
2.1	Reagenti e linee cellulari	25
2.2	Analisi al citofluorimetro	25
2.3	Estrazione dell' RNA totale.....	26
2.4	Real time RT-PCR.....	26
2.5	Analisi per Western Blot.	29
2.6	RNA interference-mediated gene silencing.....	30
3	RISULTATI.....	32
3.1	Analisi fenotipica delle linee cellulari analizzate	33
3.2	Effetto dell' IFN α sull' espressione delle molecole MHCII	35
3.3	Effetto dell' IFN α sull' espressione di CIITA.	37
3.4	Analisi del <i>signaling</i> indotto dal trattamento con IFN α e IFN γ	38
3.5	Analisi dell' effetto di IFN α e IFN γ sull' espressione di fattori coinvolti nella regolazione dei geni ISG	40
3.6	Down regolazione dell' espressione dei geni MHCII mediata da RNA interference	42
4	DISCUSSIONE.....	53
	BIBLIOGRAFIA.....	60

1 INTRODUZIONE

1.1 Le molecole MHC di Classe II

Le molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità di Classe II (MHCII), hanno un ruolo di fondamentale importanza nell'induzione e nella regolazione della risposta immune adattativa al patogeno. Tali molecole presentano ai linfociti T CD4 peptidi antigenici che derivano da proteine extra-cellulari, endocitate e processate a livello lisosomiale. Sono quindi molecole essenziali per il processo di selezione negativa e positiva che determina la specificità del repertorio delle cellule T CD4 durante il loro sviluppo nel timo, per l'omeostasi dei linfociti T CD4 maturi in periferia, e per l'inizio, l'amplificazione e la regolazione della risposta immune protettiva (Reith, 2005).

1.1.1 Struttura delle molecole MHC II

Strutturalmente tutte le molecole di Classe II sono complessi eterodimerici trans membrana, costituiti da due catene glicoproteiche, la catena α (32-34 kD) e la catena β (29-32 kD) associate non covalentemente e contenenti gruppi oligosaccaridici N-linked (Brown, 1993).

Nella struttura dell'eterodimero sono presenti una estremità extracellulare, una porzione trans-membrana idrofilica e una intracellulare corrispondente alla estremità carbossi-terminale.

La terminazione amminica è in posizione extracellulare ed è costituita da due catene comprendenti i domini $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e $\beta 1$ e $\beta 2$. La regione che lega il peptide, che è la più polimorfica, è formata dall'interazione dei segmenti $\alpha 1$ e $\beta 1$.

Le regioni $\alpha 2$ e $\beta 2$ sono domini sostanzialmente poco polimorfici di tipo immunoglobulinico e contengono ponti disolfurici interni (Figura 1).

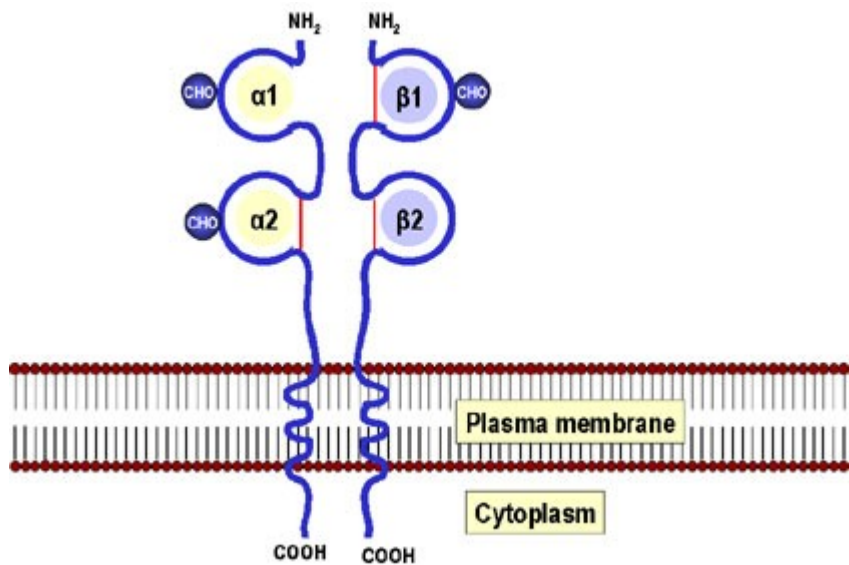


Figura 1 Rappresentazione schematica delle molecole MHCII

1.1.2 Organizzazione dei Geni MHCII di Classe II

Nel genoma umano i geni MHC sono localizzati sul braccio corto del cromosoma 6, che occupa un esteso segmento genomico di circa 3500 Kb comprendente molti geni coinvolti nella risposta immune. Tra questi ci sono i geni MHC di classe I, i geni per il complemento, i geni codificanti per proteine da shock termico e per citochine e l'intera regione HLA-D che comprende i loci dei diversi isotipi di classe II che nell'uomo sono definiti HLA-DR., HLA-DQ e HLA-DP. All'interno di questi loci possono esistere più geni funzionali codificanti la catena β e solitamente un solo gene funzionale per la catena α .

L'uso di più di un gene funzionale per la catena β permette ad alcuni prodotti dei geni di classe II di essere espressi in più di due forme alleliche, conferendo un'estrema variabilità nei domini di legame al peptidi (Figura 2).

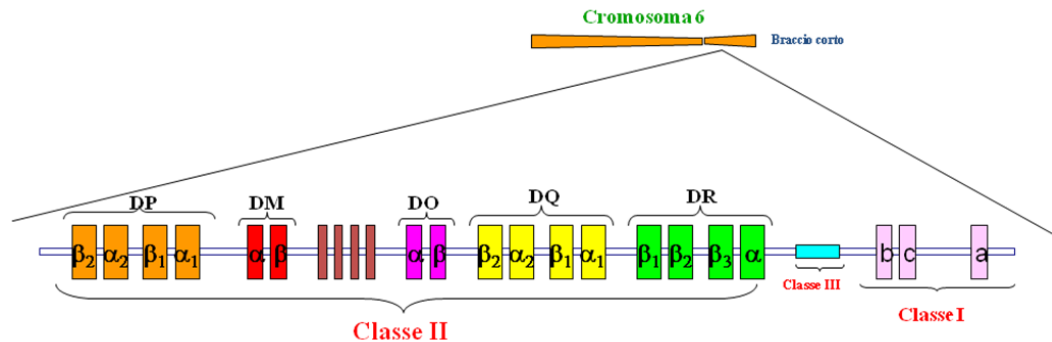


Figura 2 Mappa schematica dei geni dell'MHC umano

Tale regione contiene anche geni codificanti per le due molecole MHC II non classiche: DO e DM, implicate nel processamento dell'antigene, nel suo trasporto e nella presentazione, il gene codificante la β_2 -microglobulina, e i geni codificanti per le molecole eterodimeriche HLA-DMA e HLA-DMB aventi la funzione di favorire il legame del peptide alle molecole polimorfiche di classe II.

L'organizzazione di ciascun gene nell'uomo è conservata e comprende un primo esone codificante la sequenza leader che indirizza la proteina verso il reticolo endoplasmatico, altri quattro esoni che codificano per le diverse regioni della struttura proteica, ed infine un esone corrispondente alla 3'UTR.

1.2 Regolazione delle molecole MHCII

1.2.1 Espressione costitutiva ed inducibile

Gli antigeni MHC di classe II possono essere espressi sia in maniera costitutiva che inducibile. L'espressione costitutiva è tipica delle cellule specializzate nella cattura e presentazione dell'antigene definite Antigen Presenting Cells (APC), quali le cellule dendritiche (DC), le cellule B, le cellule della linea monocito-macrofagica, le cellule epiteliali timiche (TEC), e anche i linfociti T attivati nell'uomo.

Tutti gli altri tipi cellulari non esprimono tali molecole costitutivamente, ma la loro espressione può essere indotta da una varietà di stimoli extra cellulari, quali le infezioni, le infiammazioni o i traumi che inducono l'attivazione mediata da citochine, tra le quali l' $\text{IFN}\gamma$ è l'induttore più potente, in vivo e in vitro (O'Keefe GM, 2001). L'espressione sia costitutiva che inducibile possono essere modulate anche da parametri addizionali relativi al tipo di tessuto e al diverso stadio differenziativo delle cellule. Ad esempio nelle cellule B, essa è regolata come una funzione dello stadio di sviluppo e si estingue dopo il differenziamento in plasmacellule e aumenta se queste cellule sono trattate con LPS o IL-4. L'espressione aumenta anche nei macrofagi in seguito a trattamento con $\text{IFN}\gamma$, oppure nelle DC durante il processo di maturazione .

1.2.2 APC Professionali e non Professionali.

Le cellule che esprimono gli antigeni di classe II, sulla base della loro potenzialità nel presentare l' antigene alle cellule, sono classificate in due categorie APC professionali e non professionali.

Le cellule presentanti l'antigene di tipo professionale sono di origine ematopoietica e sono specializzate nel priming dei linfociti T naive. Tra queste abbiamo le DC, i linfociti B , le cellule della linea monocito macrofagica, tutte le cellule capaci di indurre la risposta immune sia primaria che secondaria, grazie non solo alla presentazione MHCII ristretta, ma anche alla presenza di un elevato numero di molecole costimolatorie che ne aumenta l' efficienza di funzionalità.

Le cellule presentanti l' antigene di tipo non professionale sono definite come quelle che non hanno origine dal midollo osseo e che non esprimono un completo pattern di molecole costimolatorie. Tra queste sono alcuni tipi cellulari che esprimono costitutivamente classe II come le cellule epiteliali timiche (Viret & Janeway, 1999), le cellule endoteliali, i fibroblasti, gli astrociti, (Harris et al, 2006; Kwak et al, 2000; Muczynski et al, 2003), che possono essere indotte dall' IFN γ (Harton & Ting, 2000; Steimle et al, 1994; Ting & Trowsdale, 2002).

L' espressione spuria degli antigeni MHCII da parte di cellule non derivate dal midollo osseo è stata anche descritta in cellule tumorali derivate da tessuti neoplastici ed in altre condizioni patologiche come infezioni e malattie autoimmuni (Guardiola & Maffei, 1993). Nel corso di trapianto d'organo, il rigetto dipende anche dall' espressione dell' MHC II sulle cellule endoteliali ed

epiteliali che accompagnano l'organo trapiantato a contatto con i tessuti ospitanti.
(Dallman & Mason, 1983).

1.2.3 Regolazione trascrizionale

L'espressione sia costitutiva che inducibile delle molecole MHC di classe II è regolata principalmente a livello trascrizionale (Ting & Trowsdale, 2002).

Immediatamente a monte del sito di inizio della trascrizione è stata identificata la regione del promotore, approssimativamente lunga 150-300 nucleotidi e comprendente quattro elementi di regolazione altamente conservati, sia nel topo che nell'uomo, posizionati nello stesso ordine e distanza : W o Z o S, X₁, X₂ e Y.

(Figura 3)

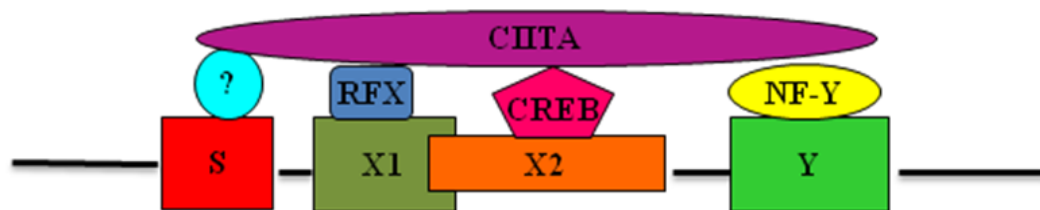


Figura 3 Regioni regolatrici e fattori di trascrizione dei geni MHC II

La box Y è composta da 10 nucleotidi, approssimativamente a 40-90 basi dal sito di inizio della trascrizione. La box X, distinta nei due elementi X₁ e X₂, parzialmente sovrapposti e lunghi rispettivamente 15 e 8 nucleotidi, è localizzata a monte della Y. A monte di X₁/X₂ c'è un altro motivo altamente conservato,

conosciuto come box S, lungo 7 coppie di basi e incluso in una box più grande denominata Z o anche W (Waldburger J.M, 2000).

Tali regioni regolatrici rappresentano dei siti di binding di più di venti fattori proteici nucleari.

La box X1 è legata al complesso trimetrico RFX costituito da RFX5, RFXANX, RFXAB, ed è sufficiente un difetto in una sola subunità per abolire la funzionalità del complesso. La box X2, è legata da X2BP/CREB. La box Y è legata dal complesso trimetrico NF-Y costituito da NF-YA, NF-YB, NF-YC, in grado di interagire specificamente con sequenze CCAAT. La box S non è stata estensivamente studiata.

I complessi proteici che legano questi elementi regolatori hanno una espressione ubiquitaria, costitutiva, e il loro legame è cooperativo. Tuttavia l'insieme di questi fattori non è sufficiente alla trascrizione dei geni HLA-D, ed è essenziale la presenza di una proteina che non lega il DNA ma che coordina l'interazione dei suddetti fattori, definita CIITA o Transattivatore di classe II (Accolla et al, 1986; Steimle et al, 1994).

1.2.3.1 CIITA.

La struttura primaria di questa proteina presenta una estremità N-terminale che contiene una regione ricca di amminoacidi acidi, adiacente ai quali c'è un dominio ricco in proline, serine e treonine (indicata come PTS). Di seguito troviamo una sequenza che conferisce attività GTPasica, e infine l'estremità C-terminale costituita da una ripetizione di leucine (leucine-rich repeats, LRR).

La regione N-terminale e la PST sono domini tipicamente presenti in molti fattori trascrizionali., ma tutti e quattro i domini, molto conservati, sono necessari affinché la proteina possa attivare il promotore di classe II.

Il modo in cui CIITA funzioni da attivatore trascrizionale è una questione ancora poco chiara. Alcuni sostengono che la sua interazione avvenga con l'apparato basale di trascrizione, o che determini un rimodellamento della cromatina nella regione promotrice reclutando l'enzima CREB che ha attività acetiltransferasica sulle proteine istoniche (Masternak, 2000). Tutti concordano sul fatto che CIITA, nell'attivazione trascrizionale dei geni MHCII, abbia il ruolo di un trans attivatore. Infatti esso non si lega direttamente al DNA ma interagisce con i fattori RFX5 e RFXANX a livello della box X1, NFYB E NFYC a livello della box Y e con CREB sulla box X, garantendo l'associazione di tutti questi componenti (Chang CH,1994, Masternak, 2002).

A differenza degli altri fattori proteici che legano direttamente il DNA ed hanno espressione ubiquitaria, CIITA ha espressione tessuto specifica ed è sempre associata all'espressione dei geni di classe II (Harton JA, 2000).

1.2.3.2 Isoforme del Trans-attivatore di classe II

L'espressione di CIITA è a sua volta regolata a livello trascrizionale.

La trascrizione del suo gene, MHC2TA, è il risultato dell'attivazione di quattro differenti e indipendenti promotori, pI, pII, pIII e pIV, che determinano l'aggiunta di un primo esone diverso per ogni trascritto.

Questo porta alla sintesi di differenti isoforme dell'mRNA, cioè trascritti con un diverso 5', e alla traduzione di proteine con un differente N-terminale. (**Figura 4**).

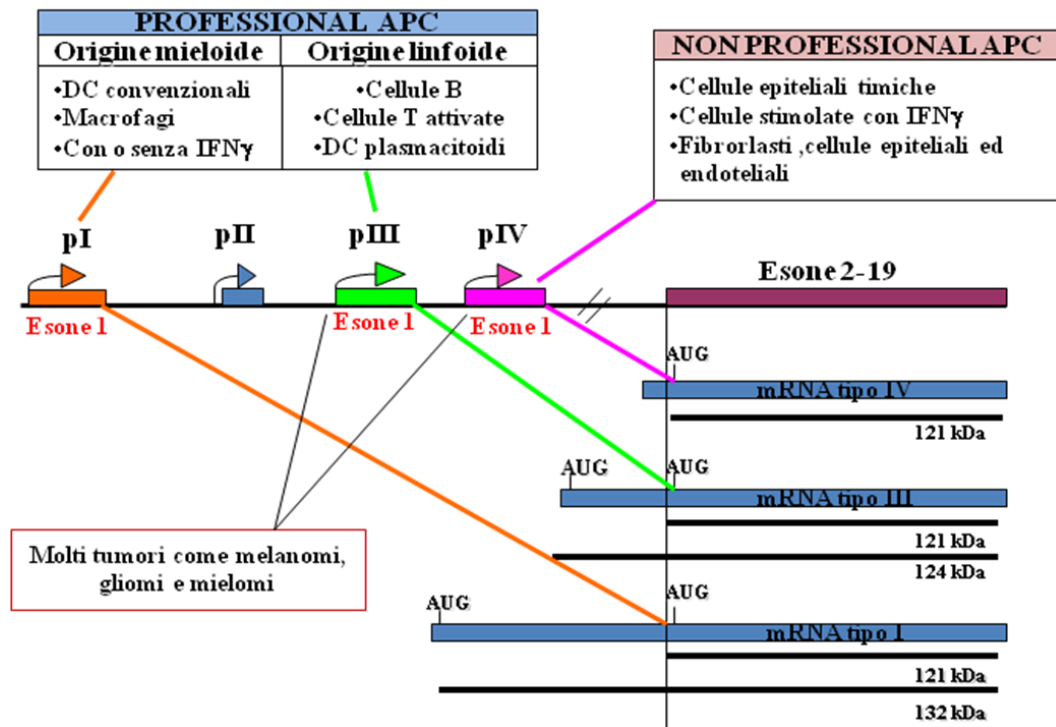


Figura 4 Isoforme di CIITA

La presenza di differenti promotori porta ad una espressione di CIITA modulata in maniera tessuto-specifica, cioè differenti fattori trascrizionali operano sui promotori alternativi a seconda del tipo cellulare specifico e in seguito a differenti segnali. (Muhlethaler-Mottet et al, 1997).

L'isoforma CIITA pI è attivo nelle APC professionali di origine mieloide come le DC convenzionali e i macrofagi attivati o meno da IFN γ . L'isoforma CIITA pIII è attiva in cellule APC professionali di origine linfoide, come i linfociti B prima del differenziamento, le cellule T attivate e le DC plasmacitoidi.

CIITA pIV è essenziale per la responsività all'IFN γ , modulando principalmente l'espressione inducibile della proteina in una varietà di APC professionali ed è

costitutivamente attiva anche in molte APC non professionali come cellule endoteliali (Harris et al, 2006; Honey & Rudensky, 2001; Muczynski et al, 2003) e tumorali, ad eccezione delle cellule dell' epitelio timico in cui l' espressione MHCII è guidata da CIITA pIV secondo un processo di regolazione differente da quello indotto dall' interferone (Masternak & Reith, 2002; Piskurich et al, 2006).

CIITA pII presenta una bassa attività nel legare la polimerasi e non si conosce ancora la funzione.

1.2.3.3 Regolazione dell'isoforma CIITA pIV

L' attivazione di CIITA pIV può essere indotta da IFN γ in molti tipi cellulari, grazie al legame con una regione sita circa 300 bp a monte del promotore .

In questa regione ci sono tre distinti elementi di regolazione: il sito GAS, la box E e il sito legante IRF-1 (IRF-E).

Il sito GAS e il box E sono legati cooperativamente dalla forma attivata della proteina STAT1 e dal fattore trascrizionale USF1. Il sito legante IRF-1 è co-occupato dai fattori trascrizionali IRF1 e IRF2 (Morris AC,2002).

Quando l'IFN γ lega il suo recettore di membrana si ha l'attivazione del sistema di trasduzione del segnale JAK/STAT. Di conseguenza il gene MHC2TA e i geni codificanti per l'MHC di classe II possono essere classificati tra i geni ISG (Interferon-Stimulated Genes).

1.2.3.4 Interferone e attivazione dei geni ISGs

Gli interferoni (IFN) sono proteine appartenenti ad una vasta classe di glicoproteine nota anche come citochine, prodotte e rilasciate dalle cellule in risposta alla presenza di agenti patogeni, come virus, batteri, parassiti o cellule tumorali. Essi influiscono sulla fisiologia delle cellule del sistema immunitario, influenzandone ad esempio la crescita e la motilità, consentono la comunicazione tra le cellule e permettono l'attivazione di differenti cellule effettrici della risposta immune (Wesoly et al, ABP 2007, Inaba K, 1986).

Gli interferoni sono divisi in due classi: interferoni di tipo I, la classe più vasta di cui fa parte l' $\text{IFN}\alpha$, che sono prodotti da diversi tipi cellulari inclusi i leucociti; e gli interferoni di tipo II, cui appartiene solo l' $\text{IFN}\gamma$ (Caraglia e al. 2004), largamente prodotto dalle cellule T e natural killer stimulate da antigeni o agenti mitogeni.

1.2.3.5 I geni ISGs e il pathway di trasduzione del segnale JAK/STAT

Tramite il legame al proprio recettore specifico di membrana, sia l' $\text{IFN}\alpha$ che l' $\text{IFN}\gamma$ possono dare rapidamente inizio all'attivazione di un signalling citoplasmatico a cascata che culmina nel riconoscimento di specifiche sequenze a livello del DNA, determinando l'espressione di quei geni conosciuti come Interferon-Stimulated Genes (ISG). Tra questi geni ce ne sono alcuni che possono essere attivati da entrambi i tipi di interferone, o preferenzialmente da uno dei due. Esistono delle similarità e delle differenze nell'azione di queste due citochine,

come conseguenza della condivisione di alcuni fattori coinvolti nel loro signaling. (Darnel et al.1994, Platanias, 2005).

Il principale pathway attivato da IFN α e IFN γ è quello di trasduzione del segnale JAK/STAT. In seguito al legame della citochina al suo recettore specifico(IFNAR per l' IFN α e IFNGR per l'IFN γ), si ha l'attivazione di due tirosine chinasi associate alla porzione citoplasmatica del recettore: Tyk2 e Jak1. Queste chinasi in seguito all' attivazione, richiamano i fattori STAT, *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STATs), una famiglia di fattori trascrizionali che regolano l' induzione di molti geni del sistema immunitario che vengono a loro volta attivati mediante la fosforilazione di una tirosina. Le proteine STATs attivate vengono liberate nel citoplasma e dimerizzano, formando omodimeri o eterodimeri con altri fattori STAT attivati. A questo punto traslocano nel nucleo e interagiscono con specifici elementi di regolazione a livello dei promotori dei geni target.

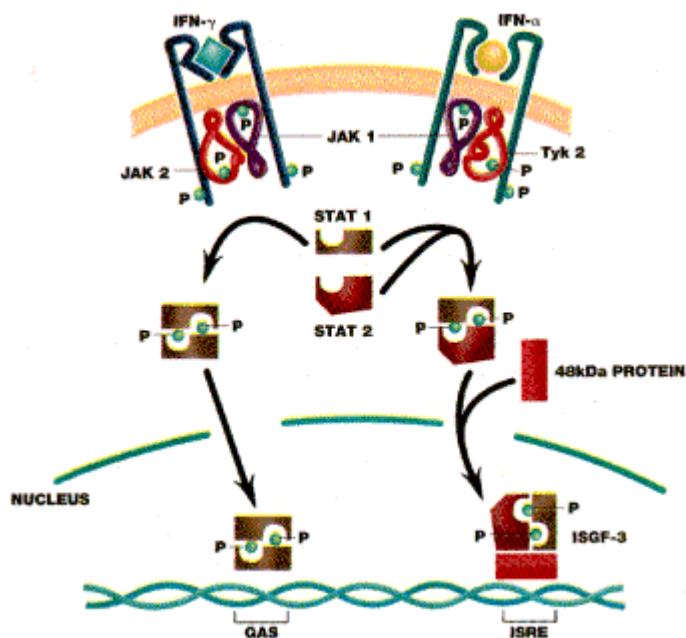


Figura 5 Rappresentazione schematica del pathway di trasduzione del segnale JAK/STAT, in seguito ad attivazione mediante IFN.

In particolare il legame dell' IFN γ al suo recettore porta alla formazione di un omodimero di STAT1 attivato, che nel citoplasma si lega alla proteina IRF9 (o p48) che presenta all'N terminale un dominio di legame al DNA e al C-terminale un dominio legante STAT, formando con questa il complesso ISGF3 che trasloca nel nucleo per attivare un gruppo di geni contenenti la sequenza GAS.

L'IFN α , invece, una volta legato al suo recettore può portare alla formazione o di un omodimero di STAT1 attivato o di un eterodimero STAT1/STAT2 attivati, si ha la formazione del complesso ISGF3 che trasloca nel nucleo per attivare un gruppo di geni contenenti la sequenza ISRE(Zhao et al. JI, 2007) (Figura 5).

1.2.3.6 Fattori coinvolti nella regolazione dei geni ISG

In seguito al legame dell' interferone al suo recettore, i segnali a cascata che ne conseguono portano all' attivazione di alcuni geni codificanti per fattori che fisiologicamente possono regolare l' effetto indotto dalla citochina stessa (Zhou et al. 2000). Tra questi fattori abbiamo le proteine IRFs (Interferon Regulatory Factor) e le proteine SOCS (Suppressor of Cytokine Signalling) (Shuai et al, Nature,2003).

Le proteine IRF, sono state originariamente identificate come fattori di trascrizione leganti i promotori dei geni dell'interferone di tipo I. Recenti studi hanno dimostrato che questi sono essenziali nella regolazione di geni attivati da queste citochine. Sono stati particolarmente caratterizzate i fattori IRF-1 e IRF-2, che all'N-terminale presentano una sequenza di legame specifico per il dominio IRF-E , che è una sequenza di regolazione presente nel promotore di molti geni attivati dall'IFN. Funzionalmente queste proteine hanno un ruolo nella stimolazione di fattori essenziali per la crescita cellulare, IRF-1 ha funzione di soppressore tumorale, IRF-2 regola positivamente l' espressione di molti geni come il gene dell' istone H4 nell' uomo. Inoltre è documentato che IRF-2 regola positivamente l' induzione da parte dell'IFN γ del trans attivatore di classe II, in particolare co-opera con IRF-1 per l'attivazione di CIITA pIV co-occupando il sito IRF-E nel promotore (Xi H. et al,2003).

Le proteine SOCS, sono un famiglia di proteine che regolano la risposta delle cellule del sistema immune alle citochine, in particolare sono dei regolatori negativi del pathway JAK/STAT. Infatti creano un feedback negativo che inibisce la trasduzione del segnale indotta dalla citochina stessa. Generalmente questi

fattori non sono molto espressi nelle cellule e nei tessuti non stimolati, ma essendo codificate da geni a loro volta inducibili da citochine in maniera STAT dipendente, vengono rapidamente trascritti e tradotti, in seguito al trattamento. Particolarmente importanti sono SOCS1 e SOCS3, le quali proteine inibiscono il signalling JAK/STAT legandosi direttamente alla tirosina fosforilata di JAK, o legandosi alla porzione citoplasmatica del recettore impedendo quindi sia il legame che la fosforilazione di STAT (Yoshimura,2007).(Figura 6)

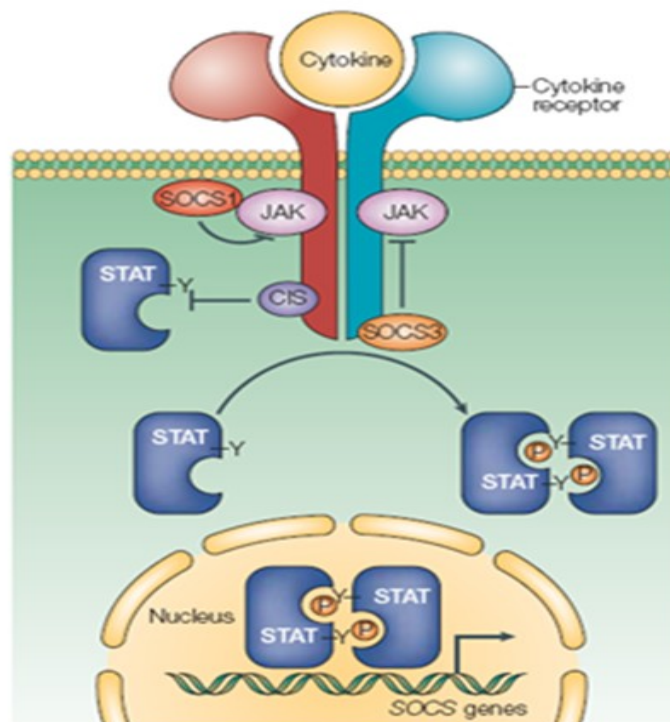


Figura 6 Controllo negativo del signaling JAK/STAT

1.3 Antigeni MHCII: riscontri in ambito patologico

Il ruolo delle molecole MHC di classe II è essenziale nella modulazione della risposta immune ed è correlabile alla loro densità sulla superficie delle cellule, alla variabilità dei geni e delle sequenze di regolazione, che ne influenzano e ne determinano l'espressione sia a livello costitutivo che inducibile. L'espressione qualitativa e quantitativa di tali molecole è associata alla suscettibilità ad alcune patologie.

1.3.1 Molecole MHC II e tumori

Sebbene i tumori derivino da tessuti self, il processo di trasformazione maligna può accompagnarsi all'espressione di molecole riconosciute sulle cellule tumorali come estranee al sistema immune.

Un'elevata frequenza di mutazioni, l'espressione deregolata di geni normali, o l'instaurarsi di tumori causati da virus trasformanti che possono esprimere proteine virali, porta alla presenza di molecole definite antigeni tumorali, le quali determinano una risposta immune contro le cellule che li esprimono (Van der Stoep N., 2002)

Per molti anni l'immunoterapia del cancro ha considerato centrale il ruolo dei linfociti T CD8 citotossici, in quanto le cellule tumorali esprimono gli antigeni associati alle molecole MHCI. Oggi però si è accresciuta l'evidenza che per un'azione anti tumorale ottimale è richiesta la presentazione dell'antigene sia ai

linfociti T CD8 che ai CD4, in quanto le cellule T helper sono un' importante fonte di citochine, come l'IFN γ attivatore dei linfociti T CD8 (Maio,2003).

Generalmente l'espressione costitutiva degli antigeni di classe II è principalmente associata alle cellule presentanti l'antigene, ma l'espressione spuria di tali molecole è stata descritta in diversi tessuti neoplastici nonché in linee cellulari da questi derivate, che talvolta possono presentarne una espressione basale costitutiva ma possono anche essere indotti da citochine (Guardiola & Maffei, 1993). Dunque, non è ancora del tutto chiaro il ruolo immunologico e funzionale della presenza di questi antigeni, soprattutto per quanto riguarda l'associazione tra l'espressione dei geni MHCII nel tumore e la prognosi clinica a questo associata. Un decremento dell'espressione in superficie degli antigeni di classe II, in alcuni tumori ematopoietici è collegata ad una maggiore aggressività del tumore (Hollin et al 2004), cosa che può essere spiegata con la perdita dell'immunosorveglianza. Non è invece chiara la relazione esistente tra l'MHC II e la prognosi negativa di tumori che non sono di origine ematopoietica, come ad esempio il carcinoma gastrico e colon rettale, il cancro alla mammella, i melanomi e i gliomi (Agarwala S et al.,2003; Goodwin BL,2001; Ghosh N,2001).

L'abilità poi di melanomi, mielomi e gliomi di esprimere l'MHCII(Goodwin BL et al, 2001) conferisce a tali cellule il ruolo di APC non professionali la cui espressione spesso deriva dall'attivazione di CIITA sotto il controllo dei promotori pIII e PIV(Reith, 2005 ; Brady MS et al., 2000).

1.3.2 Molecole MHC II: autoimmunità e trapianti

Significativo è il ruolo degli antigeni di classe II anche nell'insorgenza di processi autoimmuni, che si originano quando si verifica l'alterazione della tolleranza periferica e di quei meccanismi che consentono all'organismo di distinguere il self dal non self. Tutti i fattori coinvolti nell'attivazione trascrizionale delle molecole MHCII sono essenziali per la corretta modulazione della risposta immune, infatti nel caso di una loro mutazione, possono presentarsi gravi immunodeficienze come la BLS "Bare lymphocyte syndrome". Essenziali sono anche le sequenze di regolazione, infatti la presenza di polimorfismi in queste regioni determinano la suscettibilità a diverse patologie. Ad esempio nel caso dell'artrite reumatoide, della sclerosi multipla e dell'infarto del miocardio, mutazioni nel pIII del gene codificante CIITA determina una diminuzione dell'espressione di classe II.

Anche nel caso del diabete di tipo 1 (T1D) i geni MHCII esibiscono una stretta associazione con l'insorgenza della patologia. Numerosi lavori hanno infatti dimostrato che gli aplotipi HLA-DQ diventano un fattore che accresce l'insorgenza della patologia, anche se il preciso ruolo di classe II nella patogenesi della malattia rimane ancora sconosciuto. La presentazione del peptide associato alle molecole di classe II porterebbe ad una selezione negativa di cellule T autoreattive, e all'interruzione della tolleranza periferica che rappresenta la principale causa del meccanismo di generazione dell'autoimmunità. La presenza nelle isole pancreatiche di MHCII residenti è ancora molto controversa anche se è

stata stabilita la presenza di trascritti specifici di componenti di classe II e di proteine legate alla loro espressione (Harris,2006).

Il ruolo delle molecole HLA di Classe II è anche centrale nei processi di riconoscimento del non self. Tale è infatti l' ostacolo più rilevante nei trapianti in particolare in quelli di natura allogenica che risulta principalmente come conseguenza di due distinte forme di presentazione dell' antigene in cui sono le APC del donatore ad attivare la risposta T dell'ospite, oppure le APC dell' ospite presentano peptidi derivanti dal processamento di molecole allogeniche. Per evitare il rigetto si ricorre a terapie immunosoppressive, che riducono però drasticamente l' immunità favorendo l' insorgenza di infezioni secondarie che aumentano i tempi di ripresa e di funzionamento dell' organo trapiantato.

1.4 Obiettivo della tesi

La modulazione dell' espressione dei geni di classe II potrebbe essere un grande traguardo a livello terapeutico nella regolazione degli eventi che sono alla base dell' insorgenza di molti stati patologici. In particolare risulta di grande interesse la comprensione dei meccanismi che regolano l' espressione MHCII in quelle cellule che sono definite APC non professionali.

Il mio progetto di ricerca trae origine da alcuni dati pubblicati recentemente nel nostro laboratorio, secondo cui l'IFN α una citochina nota per il suo fondamentale ruolo nei meccanismi del sistema immunitario innato e adattativo e nella patogenesi di diverse malattie autoimmuni, *down* regola l' espressione delle molecole MHC di classe II nelle cellule APC non professionali che sono associate

alle isolette pancreatiche. Tale effetto è principalmente veicolata dall' isoforma IV del trans attivatore di Classe II (CIITA), in contrasto con quello che si verifica nelle APC professionali in cui l' IFN α *up-regola* l' espressione delle suddette molecole.

Lo scopo del mio studio è stato quello di analizzare il meccanismo in base al quale l' IFN α regola negativamente l' espressione dei geni MHC di classe II nelle cellule APC non professionali, al fine di discriminare un elemento *target* sul quale poter intervenire a scopi terapeutici mimando l'effetto biologico dell' IFN α ma che mi permetta di agire solo a livello locale senza interferire nel normale decorso funzionale del sistema immunitario centrale.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Reagenti e linee cellulari

Sono state utilizzate linee cellulari di melanoma e glioblastoma.

Le linee cellulari M14 e Me10538 sono derivate da tumori primari di pazienti affetti da melanoma (Tsuchida et al. 1987, Cancer Res 47: 1278-1281). SK MEL-23 è stata derivata da una lesione metastatica di melanoma umano (Houghton AN et al. ,198, J Exp Med). La linea cellulare U87 è stata derivata da un glioma maligno (ATCC HTB-14). Le tre linee cellulari di melanoma sono state cresciute in RPMI 1640 Medium(Bio Whittaker), mentre la linea di glioblastoma in DMEM (Bio Whittaker). Entambi i terreni di coltura sono stati supplementati con 10% FCS (Gibco) e 1% di penicillina / streptomicina (Sigma).

Per gli esperimenti di stimolazione è stato utilizzato: interferone gamma umano ricombinante, IFN γ , (Peprotech) e interferone alfa 2 b umano ricombinante, IFN α , (PBL Biomedical Laboratories).

2.2 Analisi al citofluorimetro

Per la determinazione dell' espressione in superficie delle molecole MHCII e MHCI, è stato utilizzato il citofluorimetro a flusso o FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Lo strumento è il "FACS ARIA cell-sorting" (Becton Dickinson, San Jose, Ca, USA), per l' analisi dei dati è stato utilizzato il software DIVA.

Per eseguire l'immunofluorescenza diretta sono stati usati anticorpi monoclonali specifici coniugati con fluoresceina isotiocianato (FITC). Precisamente sono stati

usati FITC Mouse Anti-Human HLA-DR, -DQ per gli isotipi di classe II e FITC Mouse Anti-Human HLA-ABC per l' MHCI. per ognuno di questi è stato utilizzato un appropriato controllo isotipo FITC Mouse IgG.

Le quantità di anticorpo utilizzate, il protocollo di colorazione e i lavaggi sono stati effettuati secondo le indicazioni della casa di produzione.

2.3 Estrazione dell' RNA totale.

L' RNA totale è stato preparato a partire da $\sim 1 \times 10^6$ cellule. L'estrazione è stata effettuata con il TRI REAGENT (Sigma), una soluzione di guanidina tiocianato e fenolo che consente in un unico passaggio di lisare le cellule e di separare l' RNA da DNA e proteine. Dopo purificazione con cloroformio e precipitazione, l'RNA estratto è stato risospeso in acqua, l' integrità e la purezza sono state verificate mediante elettroforesi su gel di agarosio all' 1.6%.

2.4 Real time RT-PCR

L analisi quantitativa di specifici trascritti è stata effettuata tramite real time RT-PCR.

Il cDNA è stato preparato con una reazione di retrotrascrizione utilizzando il QuantiTect RT Kit (QIAGEN) utilizzando 0.5 μ g di RNA totale.

Tutte le Real Time PCR sono state condotte utilizzando il QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN), in presenza di un centesimo del cDNA ottenuto per retrotrascrizione e di 0.2 μ M di primers, in un volume totale di 25 μ l.

Le condizioni di reazione sono sempre le stesse tranne che per la temperatura di annealing, che è differente a seconda della coppia di primers utilizzati.

Sono state utilizzate le seguenti condizioni di reazione: un ciclo a 95°C per 3 minuti per attivare l' enzima, seguito da 45 cicli di amplificazione (94°C per 15 secondi, 55-60 °C per 20 secondi e 72 °C per 20 secondi)

Ogni primers utilizzato è stato sintetizzato PRIMM, le specifiche sequenze e temperature di annealing sono mostrate nella Tabella 1.

Lo strumento utilizzato per le reazioni è DNA Engine Opticon Real-Time PCR Detection System (BIORAD).

Ogni reazione è stata condotta in triplicati indipendenti e ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

Per l' analisi è stata utilizzata la media del numero di copie. La quantità relativa di ogni specifico trascritto è stata calcolata usando il metodo comparativo del ciclo soglia (Livak and Schmittgen,2001), e la normalizzazione è stata fatta basandosi sull' espressione della GAPDH.

Il valore di espressione di un gene specifico è stato espresso come $2^{-\Delta\Delta CT}$ dove $\Delta\Delta CT = (cT \text{ del campione sperimentale} - cT \text{ della GAPDH}) - (cT \text{ del campione di riferimento} - cT \text{ della GAPDH di riferimento})$. cT viene definito come il numero di cicli in corrispondenza del quale la quantità di amplificato raggiunge una soglia prefissata.

Sono stati utilizzati standard esterni per stabilire una curva di interpolazione, per quantificare il numero di copie di ogni trascritto in modo assoluto, per una comparazione quantitativa.

Tabella 1 Sequenze primers

Transcript ID	Primer 5'→ 3'		Annealing temperature	Product Size
GAPDH	G-F	AACGGATTGGTCGTATTGGGC	60 °C	216 bp
	G-R	TCGCTCCTGGAAGATGGTGATG		
HLA-DRA	DRA-F	GGACAAAGCCAACCTGGAAA	60° C	120 bp
	DRA-R	AGGACGTTGGGCTCTCTCAG		
HLA-DQA1*01 ^a	A1	CGGTGGCCTGAGTTCAGCAA	63° C	158 bp
	A-R	GGAGACTTGGAACACTGTGACC		
HLA-DQA1*03 ^a	A3	CTCTGTTCCGCAGATTTAGAAGA	60° C	151 bp
	A-R	GGAGACTTGGAACACTGTGACC		
CIITA	C2TA-F	CCGACACAGACACCATCAAC	58° C	222 bp
	C2TA-R	CTTTCTGCCCAACTTCTGC		
CIITA-PIII	P3-F	CCTGGCTCCACGCCCTG	55° C	230 bp
	P-R	GAACTGGTCGCAGTTGATG		
CIITA-PIV	P4-F	GAGCTGGCGGGAGGGAG	55° C	244 bp
	P-R	GAACTGGTCGCAGTTGATG		
IRF1	IRF1-F	CCTGATACCTTCTCTGATGGACTCA	60° C	182 bp
	IRF1-R	CTGTCCGGCACAACCTCCAC		
IRF2	IRF2-F	GTCTACCGAATGCTGCCCCCT	60° C	276 bp
	IRF2-R	AATGTCTGGCGGATTGGTGA		
SOCS1	SOCS1-F	GCAGCTGCACGGCTCCT	60° C	195 bp
	SOCS1-R	GGAGACTGCATTGTCGGCTG		
SOCS3	SOCS3-F	GCGAAGGCTCCTTGTGGAC	60° C	250 bp
	SOCS3-R	GGGAAACTTGCTGTGGGTGA		

2.5 Analisi per Western Blot.

I livelli totali delle molecole STAT1, STAT3, P-STAT1, e P-STAT3 sono stati misurati tramite immunblotting di estratti proteici ottenuti da cellule trattate e non trattate con IFN α e γ , con specifici anticorpi per STAT1 (C-terminus), STAT1 (pY701), STAT3, and STAT3 (pY705) (BD Bioscience) , ed un anticorpo secondario anti-mouse IgG (Fc specifico) coniugato alla perossidasi (Sigma-Aldrich).

I lisati cellulari sono preparati da 5×10^5 cellule, cresciute in multiwell da sei pozzetti in un volume di 2 ml di terreno. Le cellule aderenti sono prelevate dalla piastra con un blando trattamento con tripsina e EDTA(Sigma-Aldrich) e lavate in PBS freddo prima di essere risospese in 100 μ l di RIPA buffer

(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40). Un cocktail di inibitori di proteasi (ROCHE) viene aggiunto al RIPA alla concentrazione di 1X prima della preparazione del campione.

Dopo 15 minuti di incubazione a 4 °C i campioni sono stati centrifugati per 1 ora a 4°C a 12,500 rpm il sovrnatante è stato recuperato, aliquotato e conservato a -80°C .

La concentrazione delle proteine negli estratti è stata determinata con il saggio Biorad (Bio-Rad Inc.), utilizzando per la definizione di una curva standard concentrazioni note di albumina sierica bovina.

Uguali quantità di proteine solubilizzate (30 μ g) e diluite in un buffer di caricamento 3X O'FARREL(glicerolo,TRIS 2M pH 6.8, 20% SD, blu di bromo

fenolo, β -mercaptoetanolo e acqua), sono state soggette ad elettroforesi su un gel di acrilamide bis (29:1). al 12.5%.

Le proteine sono state poi trasferite su una membrana PVDF (Immobilon-P, Millipore) utilizzando l' Electro blotting system della BIOMETRA.

Le membrane sono state preparate per l' immunoblot lavandole con TBST (10 mM Tris-Glycine, pH 8.0, 0.15 M NaCl, con 0.05% Tween-20). Sono state bloccate in TBST con 5% latte (BIORAD) per un' ora, lavate con TBST, e trattate con lo specifico anticorpo primario utilizzato secondo le istruzioni della casa di produzione per un' ora. Di seguito la membrana viene lavata ed incubata con la anticorpo secondario sempre per un' ora. Dopo i lavaggi le proteine sulla membrana vengono rilevate con ECL Plus detection system (Healthcare/Amersham Biosciences).

Dopo il trattamento con ECL le membrane sono state esposte alle lastre Fuji X-Ray Films (FUJIFILM Medical Systems) e le proteine sono state analizzate per chemiluminescenza mediante scansione densitometrica.

2.6 *RNA interference* mediante silenziamento genico

La trasfezione degli siRNA per il silenziamento genico è stata effettuata con HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) secondo le indicazioni della casa di produzione. Gli siRNA utilizzati sono stati sintetizzati dalla QIAGEN.

In dettaglio gli oligo diretti contro CIITA e HLA-DRA (Hs_CIITA_2 HP, Hs_CIITA_3 HP, Hs_HLA-DRA_2 HP, e Hs_HLA-DRA_3 HP) sono stati scelti nella lista di siRNA predisegnati, gli siRNA diretti contro CIITA pIV (CtPIV-a and CtPIV-b) hanno come target le seguenti sequenze CCAGAGCTGGCGGGAGGGAGA e CAGCGGTAGGTGCAGCTCACA. Le condizioni specifiche di interferenza sono state definite in maniera tale da determinare la massima efficienza di silenziamento e la minima tossicità per le cellule. L'efficienza di trasfezione è stata monitorata usando un siRNA di controllo coniugato con il fluorocromo Cy5 (QIAGEN).

La tossicità dei singoli siRNA è stata misurata per citofluorimetria colorando le cellule con 7-AAD e annexina V-FITC (BD Biosciences). Sulla base dei risultati ottenuti abbiamo definito un protocollo di silencing.

In breve: 3×10^5 cellule sono state piastrate per ogni pozzetto in piastre da sei pozzetti ed incubate a 37°C per 12 ore prima della trasfezione. Per ogni trasfezione abbiamo utilizzato 50nM di ogni siRNA. Le cellule vengono poi tripsinizzate a differenti tempi dalla trasfezione sia per l'analisi citofluorometrica che per l'estrazione dell'RNA.

3 RISULTATI

3.1 Analisi fenotipica delle linee cellulari analizzate

La prima parte del lavoro è consistita nella ricerca e caratterizzazione di un idoneo sistema in vitro che rappresentasse adeguatamente le APC non professionali, e che fosse caratterizzato da una espressione costitutiva degli antigeni MHCII.

Sono state scelte tre linee cellulari di melanoma: SK MEL-23, Me10538 e M14 , e una linea cellulare di glioma U87, per le quali è stato analizzato il pattern di espressione di HLA-DR e HLA-DQ.

A tale scopo è stata condotta un' analisi citofluorimetrica per valutarne l' espressione in superficie e le cellule sono state colorate con anticorpi monoclonali fluoresceinati diretti contro HLA-DR e HLA-DQ. Dall' analisi effettuata misurando l' intensità di fluorescenza media (MFI), è risultato che la linea cellulare di melanoma SK MEL-23 non presenta espressione delle molecole MHCII in superficie. Differentemente le altre linee di melanoma, Me10538 e M14, e per il glioma U87 ne mostrano una espressione costitutiva.

In Tabella2 sono riportati i valori di fluorescenza media (MFI) degli isotipi di classe II analizzati per tutte le linee cellulari ed anche i valori di espressione dei geni HLA di classe I come controllo. I dati ottenuti per citofluorimetria sono stati confermati dall'analisi quantitativa dei messaggeri specifici per HLA-DRA e HLA-DQA1 tramite qRTPCR.

La quantizzazione assoluta dei trascritti, espressa cioè in numero di copie, è stata possibile tramite l' utilizzo di standard specifici. Lo standard consiste in un

plasmide all' interno del quale è clonato il prodotto specifico di PCR. Di questo template così ottenuto è stato calcolato il numero di copie per un determinato volume e sono state effettuate reazioni con diluizioni seriali che vanno da 1×10^5 copie a 1 copia per campione amplificato. In questo modo si ottiene una curva standard, dalla quale per interpolazione si ricavano le misure quantitative dell' accumulo del messaggero di interesse, normalizzando tutto rispetto al messaggero GAPDH.

Come mostrato in Tabella2, la quantizzazione dei trascritti espressa in numero di copie, mostra l'assenza dei messaggeri per la linea SK MEL-23. Diversamente le linee Me10538, M14e U87 hanno una buona espressione dei trascritti rispettivamente 6455, 3222 e 4396 copie per l'mRNA di HLA-DRA e 1779, 1304 e 1609 copie per HLA-DQA1.

E' stata inoltre condotta, per tutte le linee cellulari, l'analisi della composizione relativa delle quattro isoforme di CIITA, il trans attivatore dei geni MHC II. Con una coppia di primers generici, comuni a tutte le isoforme è stato valutato che il numero di copie totali che è pari a 86 in SK MEL-23, 528 in Me10538, 408 e 587 rispettivamente in M14 e U87.

Come atteso le cellule con espressione costitutiva dei geni MHCII hanno presentato un basale e significativo accumulo del messaggero CIITA, sebbene una minima espressione sia stata evidenziata anche nella linea SK MEL-23, che non esprime gli isotipi in superficie.

Quando poi è stato analizzato il pattern di espressione dei differenti promotori di CIITA, sono state osservate differenze sia qualitative che quantitative tra le linee.

Come mostrato in Tabella 2 l'isoforma CIITA pIV costituisce il 78% dell' mRNA

di CIITA in Me10538 e il 65% in SK MEL-23, invece l' isoforma CIITA PIII costituisce il 22% in Me10538 e il 35% nel SK MEL-23.

Infine in M14 e U87 l' isoforma pIV costituisce quasi la totalità dell' mRNA specifico per CIITA, rispettivamente 99% e 98%.

3.2 Effetto dell' IFN α sull' espressione delle molecole MHCII

La fase successiva del lavoro sperimentale è consistita nel verificare l' effetto del trattamento con IFN α sulle quattro linee cellulari. Per la stimolazione 5×10^5 cellule sono state trattate con 100 U/ml della citochina. Sia le cellule indotte con l'IFN α che quelle non trattate, necessarie come controllo, sono state raccolte dopo 24, 48, e 72 ore di stimolazione.

Per tutte e quattro le linee cellulari, è stata valutata la variazione della densità in superficie degli antigeni MHCII, tramite colorazione con anticorpi fluoresceinati specifici per HLA-DR e HLA-DQ e analisi citofluorimetrica . Poiché si conosce che l' IFN α determina iper espressione delle molecole MHC di classe I, questo fenotipo è stato valutato come controllo positivo dell' effetto della citochina sull' espressione genica delle linee cellulari prese in esame. Come previsto è stato osservato un aumento di circa il doppio della densità delle molecole MHC I per le cellule trattate per 48 ore con 100U/ml della citochina rispetto a quelle non trattate (Figura 7).

Diversamente nelle cellule: Me10538 e M14, e U87, si è visto invece che il trattamento con IFN α induce un consistente decremento dell' espressione degli

antigeni di classe II in superficie principalmente dopo 48 ore. In dettaglio si è osservato per le Me10538 un decremento della densità delle molecole in superficie, misurata come MFI, di HLA-DR pari a 1.8 ± 0.2 volte e di HLA-DQ pari a 1.6 ± 0.2 volte rispetto al controllo.

Risultati simili sono stati osservati nelle M14 in cui si apprezza un decremento pari 1.5 ± 0.3 per HLA-DR e 1.3 ± 0.4 per HLA-DQ. Infine per la linea cellulare di glioma U87 si osserva una diminuzione dell' espressione in superficie di 1.4 ± 0.2 volte per HLA-DR e di 1.3 ± 0.2 volte per HLA-DQ allo stesso tempo di analisi come mostrato in Figura 7.

Per la linea di melanoma SK MEL- 23, che non presenta una espressione costitutiva degli antigeni di classe II, il trattamento con IFN α non determina effetto.

I dati ottenuti dall' analisi citofluorimetrica, sono stati confermati dalla misurazione della quantità dei trascritti specifici di HLA-DRA e HLA-DQA1, sui campioni raccolti dopo 24 e 48 ore di incubazione.

Come mostrato in figura 8A e 8B per tutte le linee cellulari la diminuzione dell' accumulo dei trascritti è già evidente a 24 ore di trattamento ma diventa più considerevole a 48 ore.

In dettaglio: a 48 ore si verifica che per le linee di melanoma c'è una riduzione del numero di copie del messaggero di HLA-DRA di 3.4 ± 0.4 volte rispetto al controllo in Me10538, 5.6 ± 0.5 volte in M14 e 10.6 ± 0.5 volte per il glioma U87 (Figura 8A).

Per quanto concerne il messaggero di HLA-DQA1 vi è un evidente decremento rispetto al controllo corrispondente a 5.1 ± 0.3 volte in Me10538, a 4.2 ± 0.4 volte in M14, e a 14.7 ± 0.5 volte in U87 (Figura 8B).

Nel loro insieme questi dati mostrano che il trattamento con l'IFN α induce la down regolazione dei geni MHCII nelle linee cellulari esaminate.

3.3 Effetto dell' IFN α sull' espressione di CIITA.

Una volta definita la diminuzione dell' espressione degli antigeni di classe II indotta dall'IFN α anche sulla base di dati recenti di letteratura (Zhao et al, 2007), è stato analizzato l'effetto sulla regolazione del trans attivatore di classe II.

E' stata quindi misurata la quantità del trascritto di CIITA nell' RNA totale estratto dalle cellule dopo 8,16, 24, 48 e 72 ore di trattamento con 100u/ml di IFN α , per tutte e quattro le linee cellulari.

Per prima cosa è stato misurato per qRT-PCR l' accumulo del trascritto totale di CIITA. Come mostrato in Figura 9A il trattamento con 100U/ml di IFN α induce nelle linee cellulari Me10538, M14 e U87,una chiara down regolazione del messaggero codificante la proteina CIITA.

La riduzione dell' RNA risulta essere evidente già a partire da 16 ore di trattamento e raggiunge il massimo effetto a 48 ore. Precisamente a 48 ore per la linea cellulare di melanoma Me10538 si è avuta una riduzione pari a $7,8 \pm 0,3$ volte rispetto al controllo non trattato con la citochina, in M14 si è verificata una

riduzione del messaggero pari a $3,0 \pm 0,4$ rispetto al controllo, e in U87 una riduzione pari al $6,2 \pm 0,4$.

Nessuna variazione significativa è stata osservata nel numero di copie di CIITA in SK MEL-23, come conseguenza del trattamento con 100U/ml di IFN α (Figura 9A).

Sulla base poi dell' analisi della composizione relativa dei trascritti di CIITA, promotore specifici(Tabella2), presenti in queste cellule, è stata effettuata una misurazione più fine del numero di copie.

L'analisi ha dimostrato che il livello di trascrizione corrispondente alle due isoforme si riduce con una cinetica lineare a quella della diminuzione di CIITA totale.(Figura 9B).

Insieme questi dati dimostrano che CIITA potrebbe essere il bersaglio molecolare dell' azione dell'IFN α nella down regolazione dei geni MHCII tramite la modulazione dell' attivazione dei suoi promotori. Infatti l'espressione costitutiva di entrambi i promotori di CIITA attivi in queste linee cellulari, pIII e PIV, è influenzata dal trattamento con questa citochina anche a basse concentrazioni.

3.4 Analisi del *signaling* indotto dal trattamento con IFN α e IFN γ

Sulla base di quanto è stato dimostrato l'IFN α determina la down regolazione degli antigeni di classe II, attraverso la modulazione dell' espressione di CIITA.

Dal momento che in letteratura è ampiamente documentato che l'IFN γ , induce un aumento dell' espressione dei geni MHC II agendo specificamente sul promotore

di CIITA, è chiaro che entrambe le citochine agiscono sullo stesso target molecolare pur inducendo un effetto biologico opposto.

Si è quindi ritenuto opportuno analizzare l'espressione delle proteine coinvolte nella regolazione trascrizionale indotta da tali citochine. A tal fine, poichè CIITA rientra nella categoria dei geni ISG (IFN-stimulated genes) la cui espressione risponde al signalling JAK/STAT (Ramana CV, 2000), sono stati valutati i livelli di espressione delle proteine STAT1 e STAT1-P, la cui attivazione è a monte del sistema di trasduzione del segnale nella via di regolazione JAK/STAT e i livelli di espressione delle proteine STAT3 e STAT3-P, coinvolte nella regolazione dell'oncogenesi e con un documentato effetto contrastante nel melanoma rispetto alle cellule effettrici del sistema immunitario.

Come mostrato in figura 10A tutte le linee cellulari, trattate con IFN γ presentano un significativo incremento dei livelli delle proteina STAT1 dopo 6 ore, mentre la proteina STAT1-P, quasi assente nei campioni non trattati, viene maggiormente espressa dopo 15 minuti, in particolare nella linea cellulare M14, e dopo 6 ore di trattamento nelle linee Me10538 e U87.

Per quanto riguarda la stimolazione con IFN α , solo SK MEL-23 ha mostrato un aumento significativo di STAT1 dopo 15 minuti di induzione; le altre linee cellulari presentano una banda visibile a 6 ore STAT1-P è invece presente dopo 15 minuti di trattamento con IFN α , con una banda di intensità superiore ma meno persistente nel tempo per tutte le linee cellulari (figura 10A).

L'analisi del livello della proteina STAT3 ha mostrato un moderato aumento dopo 6 ore di trattamento con IFN γ in tutte e quattro le linee cellulari e in maniera più significativa solo in SK MEL-23. In seguito al trattamento con IFN α c'è un

evidente aumento di espressione di STAT3 in SK MEL- 23 già a 15 minuti, invece nelle altre linee cellulari diminuisce dopo 15 minuti di trattamento rispetto al controllo. (Figura 10B).

Infine l' unica linea cellulare in esame che ha presentato l' espressione della forma fosforilata di STAT3 sia in seguito ad induzione con IFN γ che IFN α è SK MEL- 23 (Figura 10B).

In conclusione i dati ottenuti hanno permesso di osservare che l' IFN γ ha determinato una rapida, e persistente attivazione, della forma fosforilata di STAT1, mentre il trattamento con IFN α induce una rapida ma transiente attivazione di STAT1 P in tutte le linee cellulari analizzate, dimostrando una differente cinetica di attivazione di questa proteina. Non si evidenziano, invece, significative variazioni di STAT3 , la cui forma fosforilata è presente solo nelle SK23.

3.5 Analisi dell' effetto di IFN α e IFN γ sull' espressione di fattori coinvolti nella regolazione dei geni ISG

Successivamente è stato considerato l'effetto del trattamento con l' IFN γ e l'IFN α , sull' espressione di altre proteine che intervengono nelle fasi successive della regolazione trascrizionale dei geni ISG (IFN-stimulated genes). A tale scopo è stato valutato il livello di espressione di IRF1 e IRF2 (rispettivamente Interferon Regulatory Factor 1 e 2), proteine coinvolte nell' attivazione trascrizionale attraverso il loro legame a livello del promotore dei geni ISG. Inoltre è stato

misurato il livello di espressione delle proteine SOCS1 e SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling) la cui iper espressione induce una regolazione negativa nel pathway JAK/STAT, e delle quali in letteratura è documentato un ruolo nella regolazione negativa di CIITA pIV.

Le cellule sono state trattate per 24 ore con 250U/ml di IFN γ e con 100U/ml e 1000U/ml di IFN α . Anche in questo caso per valutare l' espressione delle proteine, abbiamo effettuato l'analisi dei trascritti mediante qRTPCR, usando primers specifici.

Come mostrato in figura 11A, IRF1 è poco indotto da entrambe le concentrazioni di IFN α , mentre il trattamento con IFN γ induce un accumulo del messaggero di IRF1 in tutte le linee cellulari, di circa 16 volte rispetto al controllo negativo.

In analogia al risultato ottenuto per IRF1, l'mRNA di IRF2 ha mostrato un incremento minimo in seguito a trattamento con IFN α , e in misura maggiore , di circa dieci volte rispetto al controllo in seguito a trattamento con IFN γ (Figura 11A).

Per quanto riguarda il trascritto di SOCS 3 si osserva che l' IFN γ induce un aumento del numero di copie più evidente in tutte le linee cellulari rispetto all'IFN α , che a concentrazioni di 100U/ml e 1000U/ml mostra un incremento di 1,6 e 3,0 volte in M14, di 3,1 e 7,8 volte in U87. Nessuna variazione significativa è apprezzata in SK MEL-23 e Me10538.(Figura 11B).

Infine, solo l' analisi dell' accumulo del trascritto di SOCS1 ha mostrato dei risultati qualitativamente interessanti.

Le cellule non trattate presentano un basso livello di espressione basale di tale messaggero che dopo 24 ore di trattamento con IFN γ aumenta significativamente

in un intervallo compreso tra 2×10^4 a 3×10^3 volte rispetto alle cellule non trattate. L' induzione sia con 100U/ml che con 1000U/ml di IFN α ha prodotto una up regolazione dell' espressione di SOCS1 comparabile o addirittura maggiore rispetto a quella indotta dall'IFN γ in M14 (rispettivamente di 3.2×10^3 e 1.5×10^4 volte), in Me10538 (rispettivamente di 3.2×10^3 e 1.5×10^4 volte), e U87 (rispettivamente di 7,6 volte e 1×10^6) (Figura 11B).

Considerando insieme questi risultati può essere definita significativo l' incremento dei messaggeri di IRF1 e di SOCS1 che si osserva anche a basse concentrazioni di entrambe le citochine.

3.6 Down regolazione dell' espressione dei geni MHCII mediata da RNA interference .

Alle luce dei risultati ottenuti, è chiaro che nel sistema modello di APC non professionali analizzato, la down regolazione degli antigeni MHCII, dipendente dall' IFN α è determinata dalla transiente attivazione di STAT1 e dall' aumento di SOCS1, che inducono la diminuzione del trans attivatore CIITA. E' stato per questo naturale pensare che una manipolazione che abbia come target CIITA nella APC non professionali possa garantire un effetto solo su queste cellule senza coinvolgere le funzioni degli effettori del sistema immunitario centrale. Abbiamo messo un esperimento di interferenza specifico per l' isoforma IV di CIITA, che è quella principalmente espressa in queste cellule, al fine poi di valutarne l' effetto sulla modulazione dell' espressione degli antigeni MHC II.

La prima fase, per la messa a punto del protocollo di silenziamento, è consistita nella scelta degli siRNA specifici, mentre come misura dell'efficienza di trasfezione è stato utilizzato un siRNA di controllo coniugato ad un fluorocromo (si Ctrl). Sono stati utilizzati due siRNA diretti contro sequenze comuni alle varie isoforme di CIITA (CIITA_2 e CIITA_3), e due siRNA specifici per l'isoforma IV di CIITA (CtPIV-a e CtPIV-b).

Dal momento che il transattivatore modula l'espressione di tutti gli isotipi di classe II è stato effettuato in parallelo un'inattivazione del messaggero di HLA-DRA (HLA-DRA_2 e HLA-DRA_3) al fine di valutare la specificità del processo di silencing.

Dopo 72 ore di trasfezione è stata effettuata l'analisi citofluorimetrica, con anticorpi fluoresceinati specifici per gli isotipi HLA-DR e HLA-DQ, al fine di determinare le variazioni della loro espressione in superficie.

Come mostrato in Figura 12 quando sono stati utilizzati siRNA diretti contro la sequenza del messaggero di HLA-DR è stato evidenziato per tutte le linee cellulari analizzate una riduzione della densità in superficie di questo isotipo pari a 1.4-2.0 volte utilizzando l'oligo HLA-DRA_2, e pari a 1.5-2.4 volte utilizzando HLA-DRA_3, rispetto al controllo. Come atteso l'espressione in superficie di HLA-DQ non subisce variazioni rispetto al controllo, confermando la specificità del sistema di silencing.

Sono stati poi utilizzati i due differenti siRNA specifici per le isoforme di CIITA: CIITA_2 e CIITA_3. Come mostrato in Figura 12, dopo 72 ore dalla trasfezione è stata valutata la riduzione in superficie della densità dell'eterodimero HLA-DR

rispetto al controllo, quantificata in 1.5 ± 0.1 volte in Me10538, 2 ± 0.2 volte M14 e U87.

L' effetto è stato dimostrato anche per il messaggero HLA-DQ, per il quale si osserva un decremento corrispondente a 1.4 ± 0.2 volte in Me10538, 1.2 ± 0.2 volte in M14 e 1.5 ± 0.1 volte in U87 rispetto al controllo.

Infine una significativa riduzione di entrambi gli isotipi di classe II in superficie è stata osservata utilizzando gli siRNA specifici per CIITA pIV. Come mostrato in Figura12 valutando la variazione di MFI a 72 ore di trasfezione si ottiene un decremento pari a 1.3 ± 0.1 volte in Me10538, 1.7 ± 0.1 volte in M14, e 2 ± 0.2 volte in U87 per HLA-DR. Per l' isotipo per HLA- DQ, la riduzione è di 1.3 ± 0.2 volte in Me10538 e M14, a 1.4 ± 0.1 volte in U87.

I dati ottenuti dall' analisi citofluorimetrica, sono poi stati confermati dall' analisi tramite qRT-PCR dell' accumulo dei trascritti di HLA-DRA, HLA-DQA1, CIITA, CIITA-PIV, e CIITA-PIII, su campioni analizzati a 16 e 48 ore dopo la trasfezione con i differenti siRNA . I dati hanno confermato che i due costrutti specifici per HLA-DRA determinano esclusivamente il decremento di questo messaggero specifico, invece l' uso degli siRNA per CIITA totale hanno determinato la riduzione dei trascritti di HLA-DRA e HLA-DQA1. Infine si può osservare che mentre gli siRNA specifici per CIITA totale inducono un decremento dei messaggeri dell' isoforma III e IV di CIITA, gli siRNA specifici per l' isoforma IV non determinano alcun effetto sui livelli di espressione di CIITA pIII.

In conclusione abbiamo identificato un oligo in grado di determinare la riduzione dell' isoforma CIITA pIV mimando l' effetto biologico dell' IFN α in cellule APC non professionali.

Linee cellulari		Analisi al citofluorimetro			Saggio di qRT-PCR			
Nome	Descrizione	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-ABC	HLA-DRA	HLA-DQA1	CIITA	
SK MEL-23	Da una lesione metastatica di melanoma umano	ND ^c	ND	1397	ND	ND	86	35 % CIITA-PIII
								65 % CIITA-PIV
Me 10538	Da un melanoma primario umano	935	119	1141	6455	1779	528	20% CIITA-PIII
								70% CIITA-PIV
M14		573	100	1143	3222	1304	408	1% CIITA-PIII
								99% CIITA-PIV
U87	Da un melanoma maligno primario umano	538	113	1243	4297	1609	587	2% CIITA-PIII
								98% CIITA-PIV

Tabella 2. Analisi fenotipica delle linee cellulari analizzate. La tabella mostra i valori di fluorescenza media, MFI, espressi costitutivamente per tutte le linee cellulari analizzate, dei geni HLA di classe I e degli isotipi HLA-DR e HLA-DQ di classe II.

Inoltre sono riportate i valori, espressi in numero di copie, dei messaggeri HLA-DRA, HLA-DQA1 e CIITA.

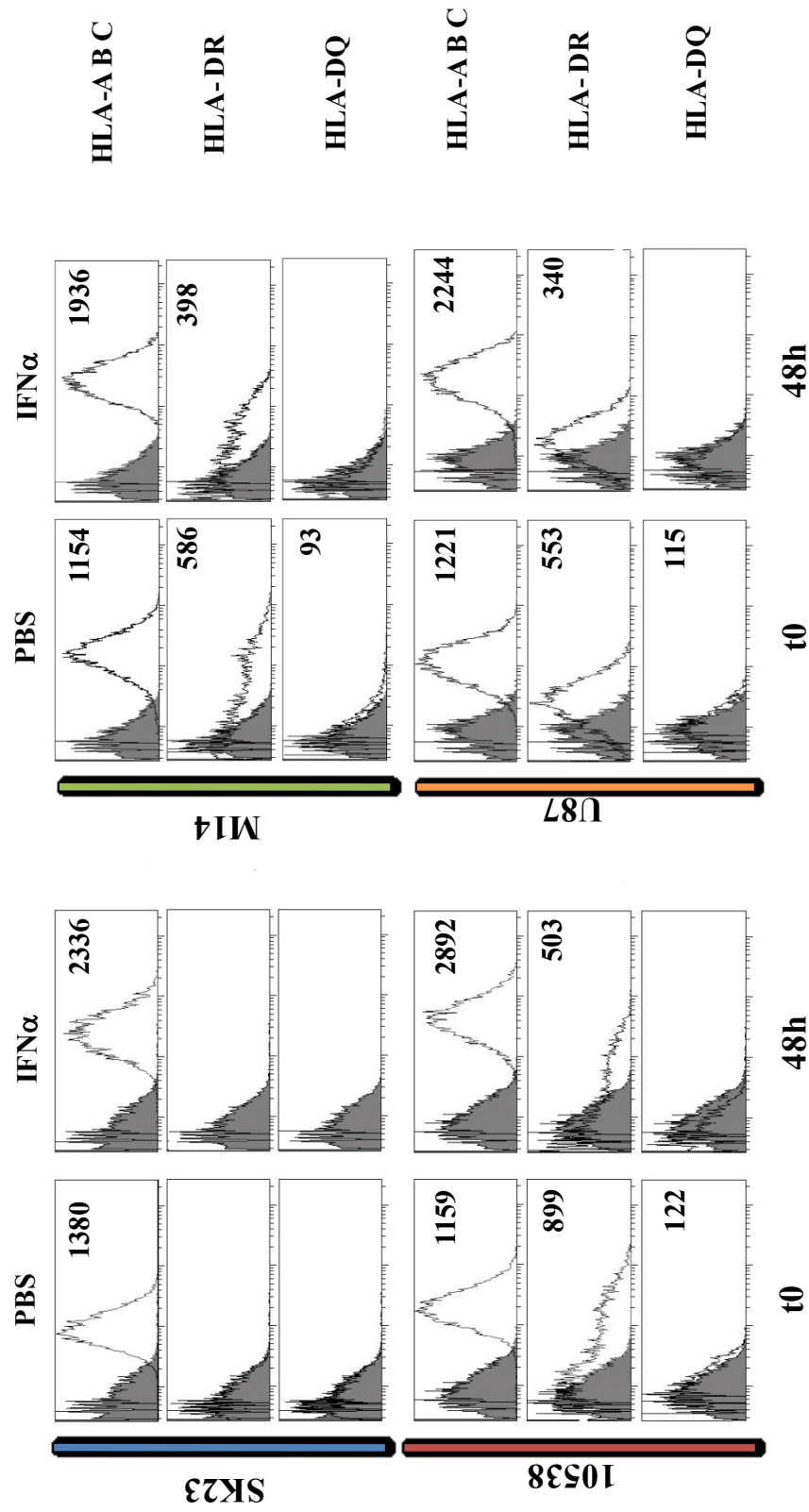


Figura 7. Effetto dell' IFN α sull' espressione in superficie delle molecole MHCII e MHC I

Analisi dell' espressione in superficie delle molecole MHCII e MHC I mediante analisi citofluorimetrica, delle linee cellulari di melanoma SK-MEL-23, Me-10538 e M14 e la linea di glioma U87, dopo di trattamento con 100U/ml di IFN α e PBS per 48 ore. In figura, sono rappresentate le sovrapposizioni degli istogrammi di fluorescenza delle cellule colorate con l' isotipo di controllo, in grigio, e degli istogrammi di fluorescenza per le cellule colorate con anticorpi fluorescenti specifici per HLA-A,B,C, HLA-DR, o HLA-DQ, mostrati in bianco. Negli istogrammi l' asse delle x rappresenta l' intensità di fluorescenza espressa in decadi logaritmiche, l' asse delle y rappresenta il numero totale degli eventi acquisiti.

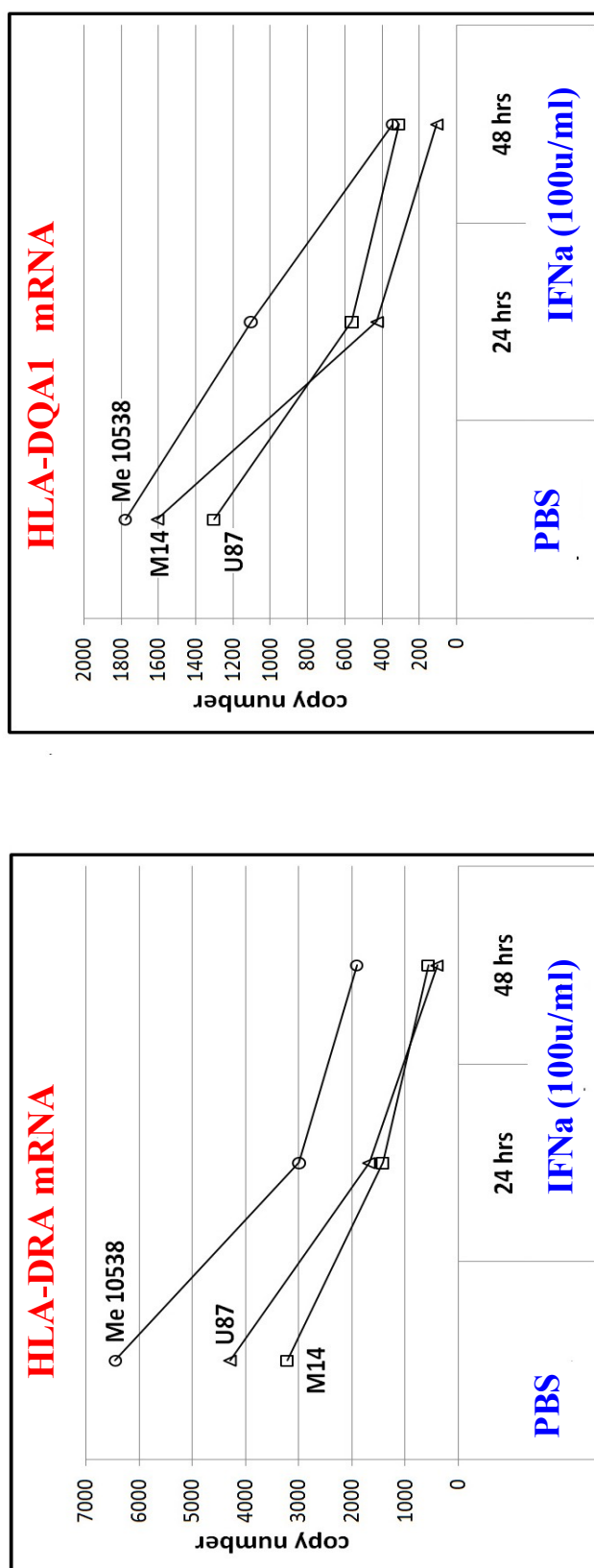


Figura 8 . Effetto dell' IFNα sull' espressione dei messengeri MHCII

Analisi dell' espressione dei messengeri HLA-DRA (8A) e HLA-DQA1 (8B), mediante qRT-PCR. Le cellule Me 10538, M14 e U87 sono state trattate con 100U/ml di IFN α o con PBS per 24 e 48 ore. In figura sono mostrati i risultati espressi in numero di copie con valore relativo rispetto al controllo.

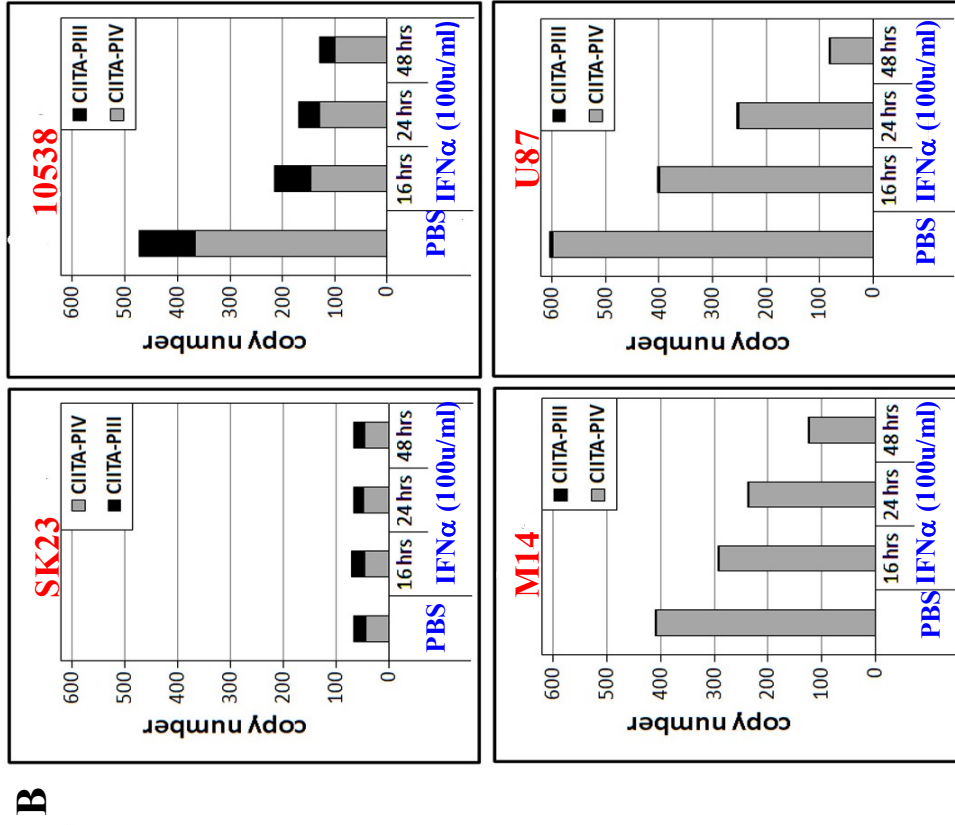
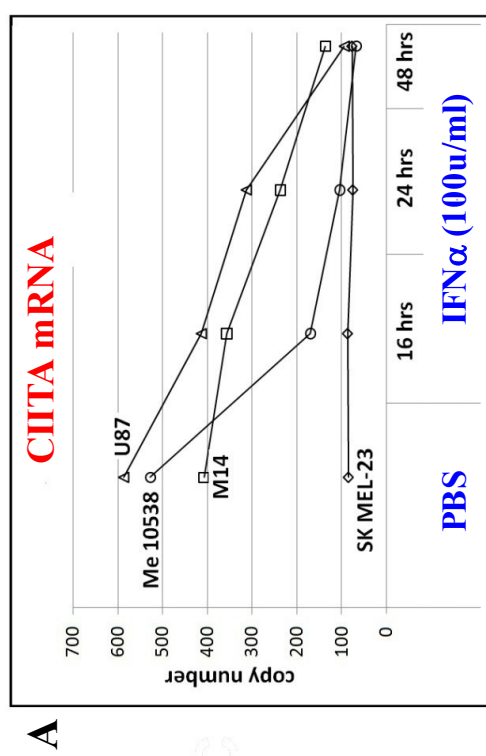


Figura 9 . Effetto dell' IFN α sull' espressione di CITA.

Analisi del messaggero di CITA totale (9A) e delle sue isoforme (9B), mediante qRT-PCR .

Le cellule Me 10538, M14 e U87 sono state trattate con 100U/ml di IFN α e con PBS per 24 e 48 ore. In figura 9A sono mostrati i risultati ottenuti con primers specifici che amplificano tutte le isoforme di CITA. In figura 9B sono mostrati i risultati ottenuti usando primers che selettivamente amplificano solo CITA pIII, frazione rappresentata in nero, o CITA pIV frazione in grigio. In figura sono mostrati i risultati espressi in numero di copie con valore relativo rispetto al controllo.

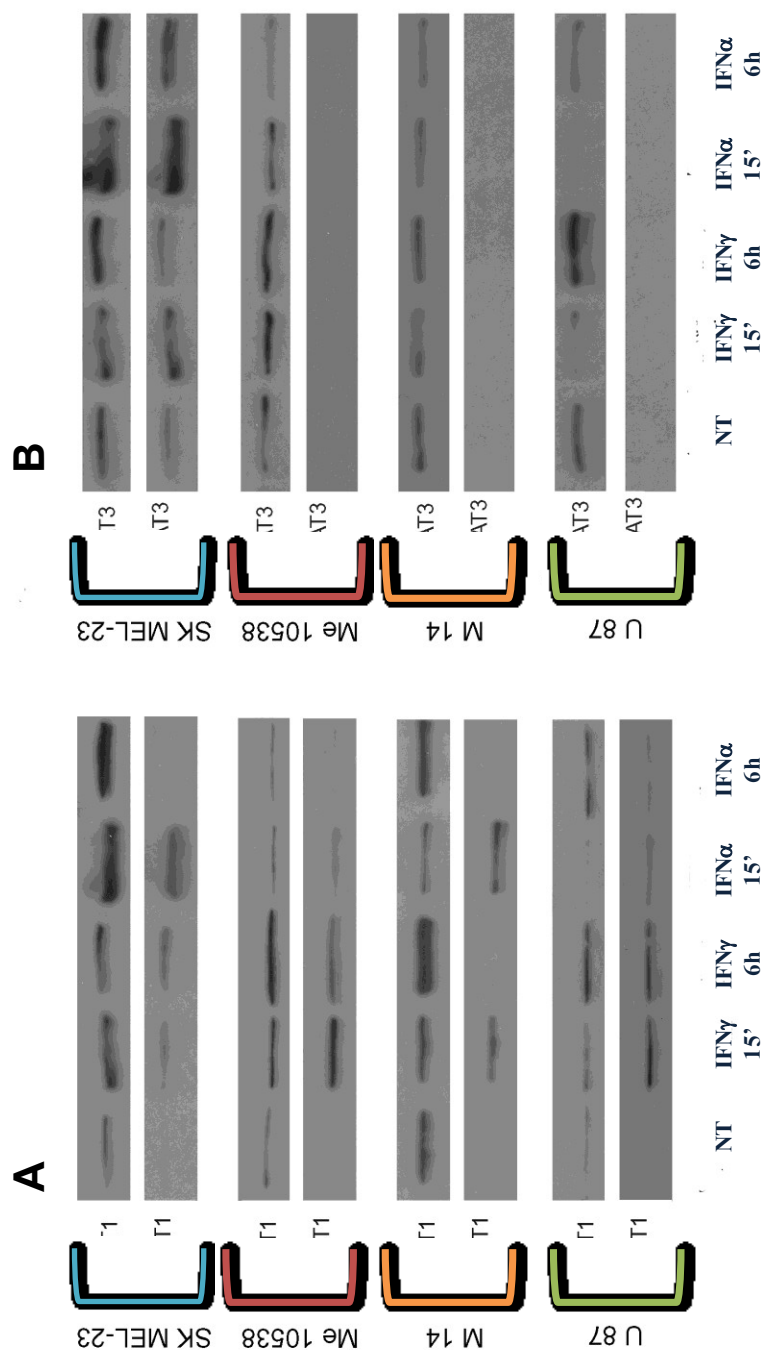


Figura 10. Effetto del trattamento con IFN α e IFN γ sull'espressione delle proteine STAT1 e STAT3
Analisi delle proteine STAT1 e STAT1-P (10A) e STAT3 e STAT3-P (9B) mediante immunoblotting con anticorpi specifici. Le cellule Me 10538, M14 e U87 sono state trattate per 15 minuti e per 6 ore con 100U/ml IFN α , 250U/ml di IFN γ e PBS.

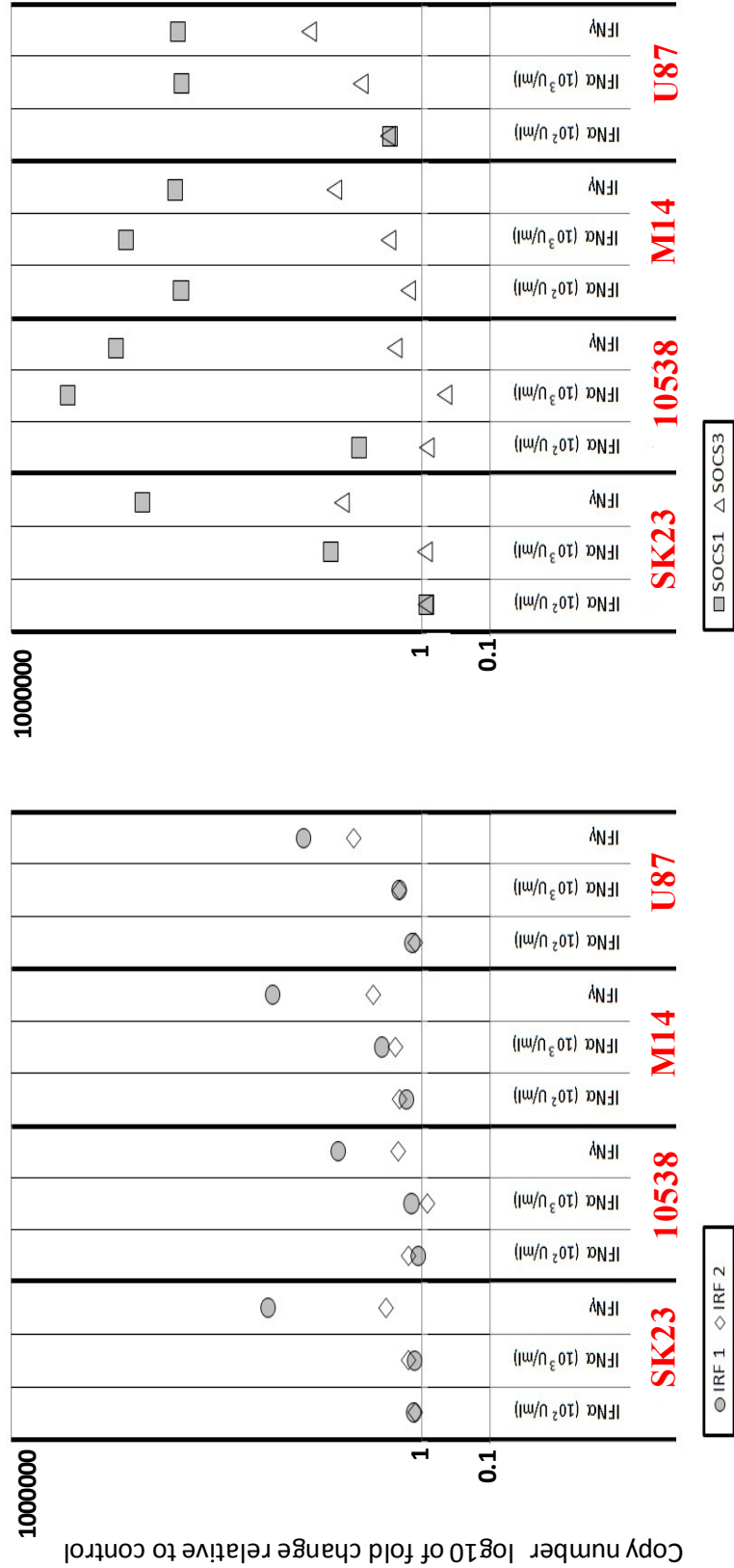


Figura 11. Effetto del trattamento con IFNα e IFNγ sull'espressione dei fattori IRF1, IRF2, SOCS1 e SOCS3

Analisi del messaggero di IRF1, IRF2 (11A), SOCS1 e SOCS3 (11B), mediante di qRT-PCR.

Le linee cellulari Me 10538, M14 e U87 sono state trattate per 24 ore con 100 e 1000U/ml IFNα, 250U/ml di IFNγ, e PBS.

In figura sono mostrati i risultati espressi in numero di copie con valore relativo rispetto al controllo.

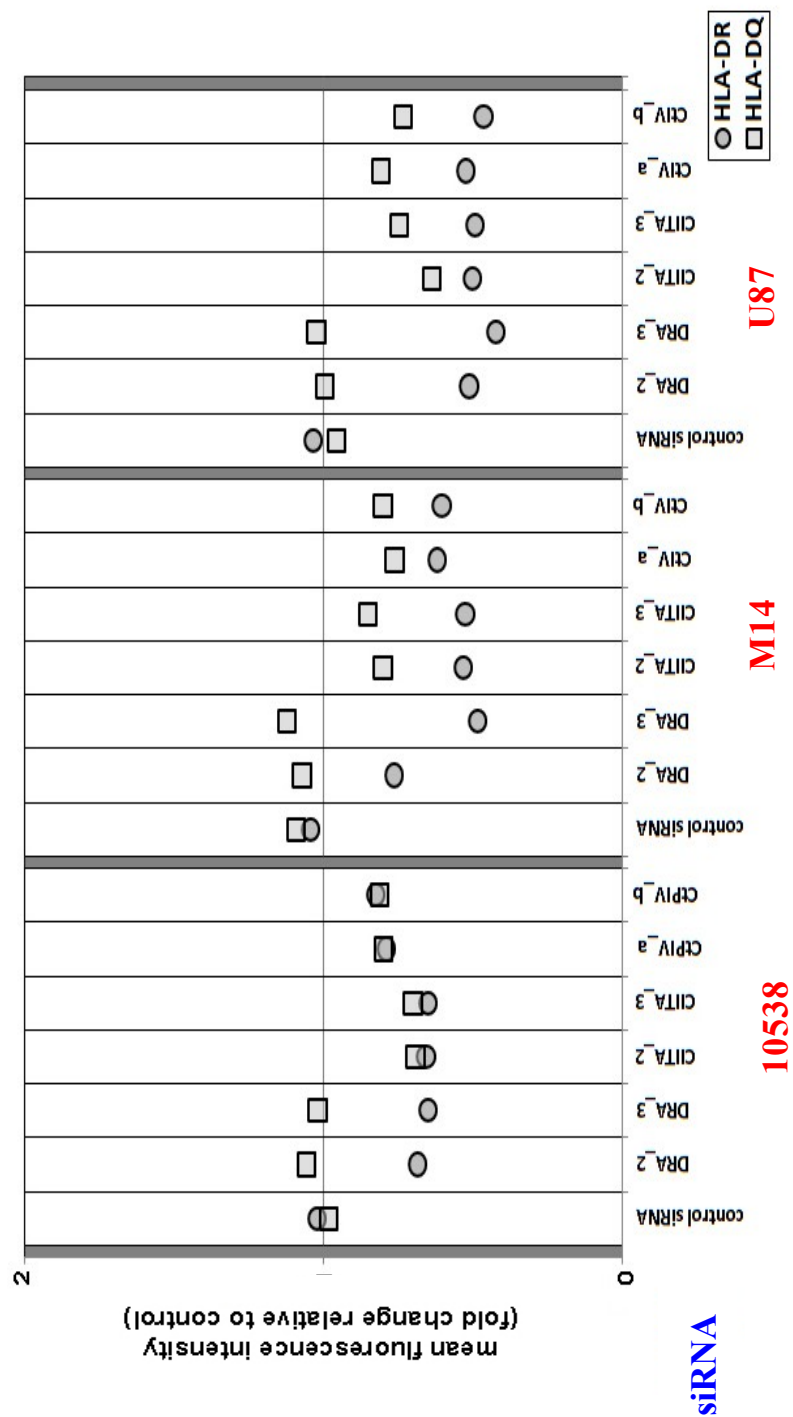


Figura 12. Analisi dell'espressione in superficie dei geni MHCII in seguito a RNA interference
Analisi dell'espressione in superficie delle molecole MHCII mediante citofluorimetria in seguito a trasfezione con gli oligo interferenti indicati.
In figura è rappresentato il valore relativo dell'MFI per le molecole HLA-DR e HLA-DQ rispetto al controllo per ogni singolo siRNA utilizzato.

4 DISCUSSIONE

Lo studio dei meccanismi molecolari che controllano l'espressione dei geni MHCII nelle cellule APC (Antigen Presenting Cells) professionali è stato fondamentale per lo sviluppo di una serie di approcci che consentono la manipolazione dell'espressione di queste molecole sia in vitro che in vivo, e quindi la modulazione della risposta immune.

Tuttavia ancora non sono chiari i meccanismi che regolano l'espressione delle molecole MHCII nelle APC non professionali e il ruolo che svolgono, considerando il fatto che la maggior parte di tali tipi cellulari è implicata nell'insorgenza di situazioni patologiche. Infatti sono APC non professionali molte cellule tumorali (Guardiola & Maffei, 1993), cellule endoteliali o epiteliali associate ad organi da trapiantare (Dallman & Mason, 1983).

Il nostro interesse riguarda le complicità che accompagnano il trapianto delle isolette pancreatiche come terapia al diabete di tipo 1, ad oggi uno dei trapianti più difficili e con minori possibilità di successo. L'ostacolo più rilevante in questo come in altri trapianti, in particolare quelli di natura allogenica, è determinato da due distinte forme di presentazione dell'antigene in cui sono le APC del donatore ad attivare la risposta T dell'ospite, oppure le APC dell'ospite presentano peptidi derivanti dal processamento di molecole allogeniche. Sulla base di quanto detto, la comprensione del meccanismo che modula l'espressione degli antigeni di classe II nelle APC non professionali potrebbe essere favorevole a livello terapeutico, in quanto faciliterebbe il trapianto di cellule allogeniche

ovviando l' immunosoppressione sistemica e tutti gli svantaggi ad essa associata, consentendo la modulazione di tali molecole a livello locale, in modo da favorire la rigenerazione e il funzionamento dell' organo trapiantato grazie all' induzione della tolleranza.

Nel caso specifico del trapianto di isolette pancreatiche, in un recente lavoro pubblicato, il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che quest' organo è strutturalmente associato a cellule endoteliali. Infatti si è visto che omogenati cellulari di pancreas esprimono i messaggeri MHCII, la cui espressione è risultata essere attivata dal promotore pIV del trans attivatore CITTA. Inoltre è stato dimostrato che il trattamento con l'IFN α in tale sistema induce una *down* regolazione degli antigeni di classe II, in antitesi a ciò che si verifica per le APC professionali, in cui la citochina ne stimola una maggiore espressione (Harris, 2006).

Il mio lavoro di dottorato ha cercato di chiarire il meccanismo in base al quale l' IFN α regola negativamente l' espressione dei geni MHC di classe II nelle cellule APC non professionali, al fine di scegliere poi un *target* molecolare, sul quale poter intervenire sperimentalmente per mimare l'effetto biologico dell' IFN α . Ciò consentirebbe di agire a livello locale senza interferire con il normale decorso funzionale del sistema immunitario centrale, problema che l'uso terapeutico di tale citochina potrebbe determinare.

Il sistema cellulare idoneo sul quale è stato svolto il lavoro, è stato selezionato in base a diverse evidenze presenti in letteratura. Sono state scelte linee cellulari di melanoma e di glioma che rappresentano

adeguatamente le APC non professionali con una espressione costitutiva di classe II, (Ruiter et al, 1984; Winchester et al, 1978, Soos et al, 2001; Yukio Takamura, 2004), e che fossero capaci di presentare l'antigene ai linfociti T CD4 (Brady et al, 2000; Soos et al, 2001; Zeng et al, 2000). Per i melanomi è già documentata la responsività all'IFN α , e la sua capacità di migliorare la prognosi della malattia (Agarwala, 2003; Kirkwood et al, 2000; Legha, 1986).

Inoltre, diverse evidenze sperimentali, mostrano un effetto antitumorale che è associato non solo all'azione svolta sulle cellule del sistema immunitario, ma anche ad un effetto antiproliferativo e antiapoptotico indotto sulle cellule del cancro (Lesinski et al, 2003; Martin-Henao et al, 2000; Raig et al, 2008; Slaton et al, 1999; von Stamm et al, 1993).

Abbiamo dimostrato, che il trattamento con 100U/mL di IFN α delle linee cellulari in esame, ha lo stesso effetto osservato per le cellule endoteliali associate alle isolette pancreatiche (Harris, 2006), e cioè si verifica un decremento degli mRNA specifici per i messaggeri HLA-DRA e HLA-DQA1, valutato mediante qRT-PCR.

Inoltre abbiamo confermato che la down regolazione dei geni MHCII è una diretta conseguenza della riduzione del trans attivatore di classe II, agendo sul promotore pIV che è la forma, più abbondantemente espressa nel nostro sistema di APC non professionali. In letteratura è ampiamente documentato che il promotore IV di CIITA è attivato dall'IFN γ , che ne determina l'*up* regolazione. Quindi si può affermare che l'IFN γ e l'IFN α

intervengono sull' espressione della stessa molecola, determinando due effetti biologici contrastanti.

Nella regolazione trascrizionale gli interferoni hanno dei meccanismi di azione comuni e di conseguenza condividono fattori implicati in questi processi. E' noto che in seguito al legame con il proprio recettore si ha l' attivazione delle due tirosin chinasi, Tyk2 e JAK che a loro volta fosforilano le proteine STAT.

Abbiamo quindi valutato i livelli di espressione delle proteine STAT, anche nella sua forma fosforilata STA1-P che si lega alla sequenza GAS presente negli elementi di regolazione del gene MHC2TA (Darnell, 1998; Dunn et al, 2006,; Pestka, 2007; Plataniias, 2005; Theofilopoulos et al, 2005). Inoltre abbiamo preso in esame le proteine STAT3 e STAT3-P a causa del loro coinvolgimento, ben documentato, nell' attivazione e regolazione dell' oncogenesi (Duan et al, 2006,; Kim et al, 2003; Kortylewski et al, 2005; Liljeroos et al, 2008; Wang et al, 2008a; Wang et al, 2008b; Yang et al, 2005) e per la loro funzionalità differente nei melanomi rispetto alle cellule effettrici del sistema immunitario (Lesinski et al, 2007; Wang et al, 2007).

Mentre per STAT3 non si osservano rilevanti variazioni, significativa è la natura transiente dell' attivazione indotta dall' IFN α su STAT1, contrapposta all' attivazione persistente indotta dall' IFN γ che codifica per CIITA, potrebbe quindi essere essenziale nella definizione di un meccanismo alla base della sua modulazione.

Poiché l'azione delle citochine è caratterizzata dal fatto che il signalling che viene attivato determina l'espressione di molti geni che influenzano la regolazione stessa, (Zhou et al. 2000), è stato necessario valutare l'espressione dei fattori IRF1 e IRF2 (rispettivamente Interferon Regulatory Factor 1 e 2), proteine coinvolte nella trascrizione dell'interferone γ e α e per le quali è già documentato il ruolo essenziale nell'attivazione di CIITA pI, in seguito al legame alla regione IRF-E nel promotore del gene (O'Keefe et al, 2001). Infine sono stati studiati anche i fattori SOCS1 e SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling), appartenenti ad una famiglia di proteine coinvolte nel pathway di regolazione negativa del signalling JAK/STAT, per il loro ruolo nella repressione IFN γ -dipendente della trascrizione di CIITA pIV (Kim et al, 2003; O'Keefe et al, 2001).

I risultati di quest'analisi hanno mostrato che le proteine IRF1, IRF2 e SOCS3 sono significativamente *up* regolate solamente dall'IFN γ , mentre l'espressione di SOCS1 è incrementata da entrambe le citochine anche se in misura significativamente maggiore dall'IFN α .

I dati ottenuti hanno permesso di capire che nel caso dell'induzione da parte dell'IFN γ c'è una rapida e persistente attivazione di STAT1, associata al significativo aumento del fattore IRF1, che determina la preferenziale *up*-regolazione di CIITA. Diversamente l'azione dell'IFN α , che è accompagnata da una espressione transiente di STAT1, ed una iper espressione del regolatore negativo SOCS1, determina un feedback-loop negativo indotto da tale proteina, che blocca la fosforilazione di STAT e

la trasmissione del signalling di attivazione trascrizionale, limitando l'espressione di CIITA .

In conclusione l'espressione costitutiva degli antigeni MHCII nelle cellule APC non professionali è sostenuta principalmente da CIITA pIV , che in tali tipi cellulari è il target del meccanismo di *down* regolazione indotto dall' $\text{IFN}\alpha$, in contrasto con quanto accade nelle APC professionali.

A questo punto abbiamo testato l'ipotesi che per abbassare i livelli di espressione dell' MHCII si poteva agire specificamente sul promotore IV di CIITA, in modo da variare solo il fenotipo di queste cellule senza coinvolgere le funzioni degli effettori del sistema immunitario centrale.

L'utilizzo di una metodica di RNA *knock down* mediante l'uso di oligo che determinassero il *silencing* dell' mRNA specifico per CIITA pIV , ha reso possibile la down regolazione dei geni MHCII specificamente in queste cellule.

Proponiamo quindi di utilizzare questa tecnologia a livello terapeutico per modulare l'espressione di questi geni in cellule APC non professionali in molti stati patologici. In particolare la down regolazione locale dei geni MHCII a livello delle cellule endoteliali che accompagnano il pancreas potrebbe facilitare i meccanismi di rigenerazione e rivascolarizzazione dell'organo trapiantato.

BIBLIOGRAFIA

Accolla RS, Jotterand-Bellomo M, Scarpellino L, Maffei A, Carra G, Guardiola J (1986) aIr-1, a newly found locus on mouse chromosome 16 encoding a trans-acting activator factor for MHC class II gene expression. *J Exp Med* **164**(1): 369-374

Agarwala S (2003) Improving survival in patients with high-risk and metastatic melanoma: immunotherapy leads the way. *Am J Clin Dermatol* **4**(5): 333-346

Agarwala SS, Kirkwood JM (1995) Potential uses of interferon alpha 2 as adjuvant therapy in cancer. *Ann Surg Oncol* **2**(4): 365-371

Alexander WS (2002) Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**(6): 410-416

Biron CA (2001) Interferons [alpha] and [beta] as Immune Regulators--A New Look. *Immunity* **14**(6): 661-664

Brady MS, Lee F, Petrie H, Eckels DD, Lee JS (2000) CD4(+) T cells kill HLA-class-II-antigen-positive melanoma cells presenting peptide in vitro. *Cancer Immunol Immunother* **48**(11): 621-626

Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Stern L.J., Urban R.G., Strominger J.L., and Wiley D.C.. Three dimensional structure of the class II histocompatibility antigen HLA DR1. *Nature*, 1993, 364: 33-39.

Chang CH, Fontes JD, Peterlin M, Flavell RA (1994) Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J Exp Med* **180**(4): 1367-1374

Chen H, Gilbert CA, Hudson JA, Bolick SC, Wright KL, Piskurich JF (2007) Positive regulatory domain I-binding factor 1 mediates repression of the MHC

class II transactivator (CIITA) type IV promoter. *Molecular Immunology* **44**(6): 1461-1470

Dallman MJ, Mason DW (1983) Induction of Ia antigens on murine epidermal cells during the rejection of skin allografts. *Transplantation* **36**(2): 222-224

Darnell JE, Jr. (1998) Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res* **18**(8): 549-554

Deffrennes V, Vedrenne J, Stolzenberg M-C, Piskurich J, Barbieri G, Ting JP, Charron D, Alcaide-Loridan C (2001) Constitutive Expression of MHC Class II Genes in Melanoma Cell Lines Results from the Transcription of Class II Transactivator Abnormally Initiated from Its B Cell-Specific Promoter. *J Immunol* **167**(1): 98-106

Dellabona P, Latron F, Maffei A, Scarpellino L, Accolla RS (1989) Transcriptional control of MHC class II gene expression during differentiation from B cells to plasma cells. *J Immunol* **142**(8): 2902-2910

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* **6**(11): 836-848

Ghosh N, Gyory I, Wright G, Wood J, Wright KL (2001) Positive Regulatory Domain 1 Binding Factor 1 Silences Class II Transactivator Expression in Multiple Myeloma Cells. *J Biol Chem* **276**(18): 15264-15268

Goodwin BL, Xi H, Tejiram R, Eason DD, Ghosh N, Wright KL, Nagarajan U, Boss JM, Blanck G (2001) Varying functions of specific major histocompatibility class II transactivator promoter III and IV elements in melanoma cell lines. *Cell Growth Differ* **12**(6): 327-33

Guardiola J, Maffei A (1993) Control of MHC class II gene expression in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *Crit Rev Immunol* **13**(3-4): 247-268

Harris PE, Malanga D, Liu Z, Hardy MA, Souza F, Del Pozzo G, Winchester RJ, Maffei A (2006) Effect of interferon alpha on MHC class II gene expression in ex vivo human islet tissue. *Biochim Biophys Acta* **1762**(6): 627-635

Harton JA, Ting JPY (2000) Class II Transactivator: Mastering the Art of Major Histocompatibility Complex Expression. *Mol Cell Biol* **20**(17): 6185-6194

Honey K, Rudensky A (2001) The pIV-otal class II transactivator promoter regulates major histocompatibility complex class II expression in the thymus. *J Exp Med* **194**(4): F15-18

Houghton AN, Real FX, Davis LJ, Cordon-Cardo C, Old LJ (1987) Phenotypic heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanoma cells. *J Exp Med* **165**(3): 812-829

Inaba K, Kitaura M, Kato T, Watanabe Y, Kawade Y, Muramatsu S (1986) Contrasting effect of alpha/beta- and gamma-interferons on expression of macrophage Ia antigens. *J Exp Med* **163**(4): 1030-1035

Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS, Smith TJ, Rao U, Steele M, Blum RH (2000) High- and Low-Dose Interferon Alfa-2b in High-Risk Melanoma: First Analysis of Intergroup Trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* **18**(12): 2444-2458

Kortylewski M, Jove R, Yu H (2005) Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer and Metastasis Reviews* **24**(2): 315-327

Legha SS (1986) Interferons in the treatment of malignant melanoma. A review of recent trials. *Cancer* **57**(8 Suppl): 1675-1677

Lesinski GB, Anghelina M, Zimmerer J, Bakalakos T, Badgwell B, Parihar R, Hu Y, Becknell B, Abood G, Chaudhury AR, Magro C, Durbin J, Carson WE, 3rd (2003) The antitumor effects of IFN-alpha are abrogated in a STAT1-deficient mouse. *J Clin Invest* **112**(2): 170-180

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-408

Masternak K, Muhlethaler-Mottet A, Villard J, Zufferey M, Steimle V, Reith W (2000) CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev* **14**(9): 1156-1166

Masternak K, Reith W (2002) Promoter-specific functions of CIITA and the MHC class II enhanceosome in transcriptional activation. *Embo J* **21**(6): 1379-1388

Morris AC, Beresford GW, Mooney MR, Boss JM (2002) Kinetics of a gamma interferon response: expression and assembly of CIITA promoter IV and inhibition by methylation. *Mol Cell Biol* **22**(13): 4781-4791

Muhlethaler-Mottet A, Di Berardino W, Otten LA, Mach B (1998) Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* **8**(2): 157-166

Muhlethaler-Mottet A, Otten LA, Steimle V, Mach B (1997) Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *Embo J* **16**(10): 2851-2860

Muczynski KA, Ekle DM, Coder DM, Anderson SK (2003) Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. *J Am Soc Nephrol* **14**(5): 1336-1348

O'Keefe GM, Nguyen VT, Ping Tang L, Benveniste EN (2001) IFN- γ Regulation of Class II Transactivator Promoter IV in Macrophages and Microglia: Involvement of the Suppressors of Cytokine Signaling-1 Protein. *J Immunol* **166**(4): 2260-2269

Pazmany T, Tomasi TB (2006) The major histocompatibility complex class II transactivator is differentially regulated by interferon-gamma and transforming growth factor-beta in microglial cells. *J Neuroimmunol* **172**(1-2): 18-26

Piskurich JF, Gilbert CA, Ashley BD, Zhao M, Chen H, Wu J, Bolick SC, Wright KL (2006) Expression of the MHC class II transactivator (CIITA) type IV promoter in B lymphocytes and regulation by IFN-gamma. *Mol Immunol* **43**(6): 519-528

Piskurich JF, Lin KI, Lin Y, Wang Y, Ting JP, Calame K (2000) BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol* **1**(6): 526-532

Platanias LC (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* **5**(5): 375-386

Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR (2000) Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* **19**(21): 2619-2627

Raig ET, Jones NB, Varker KA, Benniger K, Go MR, Biber JL, Lesinski GB, Carson WE (2008) VEGF Secretion is Inhibited by Interferon-Alpha in Several Melanoma Cell Lines. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **28**(9): 553-562

Reith , Salom,| LeibundGut-Landmann & Jean-Marc Waldburger (2005) Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator *Nature Reviews Immunology* **5**, 793–806

Ruiter DJ, Bergman W, Welvaart K, Scheffer E, van Vloten WA, Russo C, Ferrone S (1984) Immunohistochemical Analysis of Malignant Melanomas and Nevocellular Nevi with Monoclonal Antibodies to Distinct Monomorphic Determinants of HLA Antigens. *Cancer Res* **44**(9): 3930-3935

Shuai K, Schindler C, Prezioso VR, Darnell JE, Jr. (1992) Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* **258**(5089): 1808-1812

Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CPN, Fidler IJ (1999) Interferon- α -mediated Down-Regulation of Angiogenesis-related Genes and Therapy of Bladder Cancer Are Dependent on Optimization of Biological Dose and Schedule. *Clin Cancer Res* **5**(10): 2726-2734

Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B (1994) Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* **265**(5168): 106-109

Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH (2005) Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* **23**: 307-335

Ting JP, Trowsdale J (2002) Genetic control of MHC class II expression. *Cell* **109** Suppl: S21-33

van den Elsen PJ, van der Stoep N, Vi tor HE, Wilson L, van Zutphen M, Gobin SJP (2000) Lack of CIITA expression is central to the absence of antigen presentation functions of trophoblast cells and is caused by methylation of the IFN-[gamma] inducible promoter (PIV) of CIITA. *Human Immunology* **61**(9): 850-862

van den Elsen PJ, van der Stoep N, Yazawa T (2003) Class II Transactivator (CIITA) Deficiency in Tumor Cells: Complicated Mechanisms or Not? *Am J Pathol* **163**(1): 373-376

van der Stoep N, Biesta P, Quinten E, van den Elsen PJ (2002) Lack of IFN-gamma-mediated induction of the class II transactivator (CIITA) through promoter methylation is predominantly found in developmental tumor cell lines. *Int J Cancer* **97**(4): 501-507

Viret C, Janeway CA, Jr. (1999) MHC and T cell development. *Rev Immunogenet* **1**(1): 91-104

von Stamm U, Brocker EB, von Depka Prondzinski M, Ruiter DJ, Rumke P, Broding C, Carrel S, Lejeune FJ (1993) Effects of systemic interferon-alpha (IFN-alpha) on the antigenic phenotype of melanoma metastases. EORTC melanoma group cooperative study No. 18852. *Melanoma Res* **3**(3): 173-180

Waldburger J-M, Suter T, Fontana A, Acha-Orbea H, Reith W (2001) Selective Abrogation of Major Histocompatibility Complex Class II Expression on Extrahematopoietic Cells in Mice Lacking Promoter IV of the Class II Transactivator Gene. *J Exp Med* **194**(4): 393-406

Wang W, Edington HD, Rao UNM, Jukic DM, Land SR, Ferrone S, Kirkwood JM (2007) Modulation of Signal Transducers and Activators of Transcription 1 and 3 Signaling in Melanoma by High-Dose IFN{alpha}2b. *Clin Cancer Res* **13**(5): 1523-1531

Wang W, Edington HD, Rao UNM, Jukic DM, Wang H, Shipe-Spotloe JM, Kirkwood JM (2008b) STAT3 as a Biomarker of Progression in Atypical Nevi of Patients with Melanoma: Dose-Response Effects of Systemic IFN[alpha] Therapy. *J Invest Dermatol* **128**(8): 1997-2002

Wesoly J, Szweykowska-Kulinska Z, Bluysen HA (2007) STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses. *Acta Biochim Pol* **54**(1): 27-38

Winchester RJ, Wang C-Y, Gibofsky A, Kunkel HG, Lloyd KO, Old LJ (1978) Expression of Ia-Like Antigens on Cultured Human Malignant Melanoma Cell Lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **75**(12): 6235-6239

Xi H, Blanck G (2003) The IRF-2 DNA binding domain facilitates the activation of the class II transactivator (CIITA) type IV promoter by IRF-1. *Molecular Immunology* **39**(11): 677-684

Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE, Stark GR (2005a) Novel Roles of Unphosphorylated STAT3 in Oncogenesis and Transcriptional Regulation. *Cancer Res* **65**(3): 939-947

Yang WS, Han NJ, Kim CS, Ahn H, Lee SK, Lee KU, Park SK (2005b) STAT1-independent down-regulation of interferon-gamma-induced class II transactivator and HLA-DR expression by transforming growth factor beta-1 in human glomerular endothelial cells. *Nephron Exp Nephrol* **100**(3): e124-131

Yukio Takamura HITKMTTTHKIHNS (2004) Regulation of MHC class II expression in glioma cells by class II transactivator (CIITA). *Glia* **45**(4): 392-405

Zeng G, Touloukian CE, Wang X, Restifo NP, Rosenberg SA, Wang R-F (2000) Identification of CD4+ T Cell Epitopes from NY-ESO-1 Presented by HLA-DR Molecules. *J Immunol* **165**(2): 1153-1159

Zhao W, Cha EN, Lee C, Park CY, Schindler C (2007) Stat2-Dependent Regulation of MHC Class II Expression. *J Immunol* **179**(1): 463-471

Zimmerer JM, Lesinski GB, Kondadasula SV, Karpa VI, Lehman A, RayChaudhury A, Becknell B, Carson WE, III (2007) IFN- α -Induced Signal Transduction, Gene Expression, and Antitumor Activity of Immune Effector Cells Are Negatively Regulated by Suppressor of Cytokine Signaling Proteins. *J Immunol* **178**(8): 4832-4845